

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin,
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

Studien zur Integrität, Barrierefunktion und Thrombogenität der Intima koronarer Bypass-Segmente venösen Ursprungs

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Sebastian Geier

aus
Passau

Jahr
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stephan Nees

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Hae-Young Sohn
Priv. Doz. Dr. René Bombien

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ---

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Materialien	5
2.1 Verbrauchsmaterialien	5
2.2 Chemikalien	6
2.3 Lösungen	7
2.4 Geräte	9
3 Methoden	10
3.1 Etablierung konfluenter Gewebefilme von humanen Endothelzellen venösen Ursprungs (V. saphena) in Reinkultur in Petrischalen sowie im „Transwell – Kultivations-System“	10
3.2 Histologische Techniken	10
3.3 Mikrokinematographische Beobachtung des Verhaltens gezüchteter Endothelzellen während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße	13
3.4 Filtrierbarkeit von Bypass-Präservationslösungen über konfluente venöse Endothelschichten während der Inkubation mit verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße	14
3.5 Exemplarische Inspektion der Intimaoberfläche von Reststücken venöser Bypass-Segmente humaner V. saphena Gefäße (gewonnen während koronaren Bypassoperationen) nach Silberimprägnierung unter pilotmäßigem Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades	14
3.6 Messung der Aktivierung von Gerinnungsfaktor X in der V. auricularis magna des Schweineohres	16
3.7 Messung der Faktor Xa Bildungsrate im Lumen von venösen Bypass-Segmenten humaner Herkunft	22
4 Ergebnisse	26
4.1 Etablierung konfluenter Gewebefilme von humanen Endothelzellen venösen Ursprungs (V. saphena) in Reinkultur in Petrischalen sowie im „Transwell – Kultivations-System“	26
4.2 Mikrokinematographische Beobachtung des Verhaltens gezüchteter Endothelzellen während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße	26

II

4.3	Filterierbarkeit von Bypass-Präservationslösungen über konfluente venöse Endothelgewebe während der Inkubation in verschiedenen Präservationslösungen	30
4.4	Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Inspektion der Intimaoberfläche venöser Bypass-Segmente nach Lagerung in verschiedenen Präservationslösungen und anschließender Perfusion mit autologem Vollblut	31
4.5	Pilotmäßiger Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades von unterschiedlich präservierten und anschließend mit Silber imprägnierten Bypassgefäßen	33
4.6	Messung der Aktivierung von Gerinnungsfaktor X in der V. auricularis des Schweineohres und in humanen V. saphena Segmenten	38
5	Diskussion	43
5.1	Beobachtungen an humanen Endothelzellen	43
5.2	Exemplarische Inspektion der Intimaoberfläche von venösen Bypass-Segmenten nach Silberimprägnierung mit pilotmäßigem Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades und anschließender Bahnung weiterführender Planimetrie-Verfahren mit zweckmäßigerer Technik	45
5.3	Hämostaseologische Untersuchungen an verschieden präservierten Venensegmenten	47
5.4	Weitreichende pathophysiologische Konsequenzen der Deendothelialisierung venöser Bypass-Grafts	49
6	Zusammenfassung	54
	Literaturverzeichnis	57
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	61
	Danksagung	62
	Lebenslauf	63

1 Einleitung und Zielsetzung

Trotz der viel besseren Offenheitsraten von Bypassgefäßen arteriellen Ursprungs [19,24,41,56] ist der Einsatz von Venenmaterial für denselben Zweck schon aus logistischen Gründen unverzichtbar. Die sich daraus ergebenden Probleme sind beträchtlich. Etwa 4-5 Millionen koronare Bypass-Operationen und ungefähr 750.000 perkutane koronare Interventionen (PCI) werden alleine in den USA jedes Jahr durchgeführt [22]. Dabei okkludieren 15-30 Prozent der transplantierten Venensegmente schon innerhalb des ersten Jahres [52], wobei die Hälfte davon schon nach zwei postoperativen Wochen nicht mehr offen ist. 50 Prozent der übrig bleibenden venösen Bypassgefäße verstopfen dann noch innerhalb der folgenden 9 Jahre mit jährlich ansteigender Rate. Die restlichen Transplantate venösen Ursprungs zeigen deutliche angiographisch nachweisbare Funktionseinschränkungen, die Hälfte davon sogar schwere Stenosegrade [11,23,60].

Die zugrundeliegenden pathogenetischen Prozesse wurden unter dem Begriff „saphenous vein graft disease“ (SVGD) zusammengefasst [45,52]. Wenn diese Erkrankung zu wiederkehrenden ischämischen Zuständen führt, folgt daraus eine beträchtliche therapeutische Problematik. Eine Revaskularisierung lässt sich im Prinzip durch eine erneute koronare Bypass-Operation oder durch PCI erreichen. Erstere hat eine schlechtere klinische Prognose als die Erstoperation, was sich durch erhöhte perioperative Nebenwirkungen (3-11%) und eine größere Sterblichkeit ausdrückt (3-7%) [52,70]. Die PCI dagegen zögert eine letztlich notwendige Bypass-Operation nur hinaus. Die anfänglich hochgelobten arzneimittelfreisetzenden Stents haben die Situation klinisch nicht deutlich verbessert [30,36,38]. Im Hinblick auf die insgesamt erheblichen Krankheitskosten und wegen der anhaltenden Gefährdung der Patienten muss also leider festgestellt werden, dass die Prognose der meisten koronaren Bypass-Operationen - ganz besonders aber im Hinblick auf die oft unvermeidbare Verwendung von Bypasssegmenten venösen Ursprungs - trotz aller technischer Errungenschaften nach wie vor relativ unbefriedigend ist.

Vor dem gegebenen Hintergrund wird es verständlich, dass die Pathogenese der SVGD weltweit mit dem Ziel intensiv erforscht wird, die Qualität insbesondere der unverzichtbaren venösen Bypass-Gefäße zu verbessern [44]. Drei, von ihrer zeitlichen Entwicklung und Mechanistik her ganz verschiedene Krankheitskomplexe können mittlerweile untereinander abgegrenzt werden: die akute intravasale Thrombose [52], die intimale Hyperplasie [44,45,52] und die Arteriosklerose [21,43,46], welche oft noch von Infektionen begleitet wird [45,52].

Obwohl die begleitenden Krankheitssymptome und pathogenetischen Reaktionsmuster sehr den typischen Erkrankungsstadien von Koronararterien ähneln, gibt es doch eine Reihe von Unterschieden, was den zeitlichen Ablauf und das histologische Gefüge in koronararterielle Position verpflanzter und dann erkrankter Venensegmente anbelangt [16,52]. Einer der Hauptunterschiede betrifft die rasche Progression der "Arteriosklerose" in transplantierten Venen. Ein weiterer Unterschied liegt in der diffusen, konzentrischen und bröckeligen Formung der Plaques. Die Tatsache, dass vor allem im Bereich von Stenosen erkrankter Bypass-Venen sehr häufig plötzliche, massive Gerinnungsprozesse auftreten, ist dabei besonders auffällig. In einer systematischen Untersuchung resezierter koronarer Venen-Grafts konnten in 69 Prozent der Fälle Fibrinthromben für den zur Re-Operation führenden Verschluss verantwortlich gemacht werden [62].

Allgemeine Übereinstimmung besteht darüber, dass eine Schädigung oder sogar Abschilferung des luminalen Endothelgewebes der Auslöser für die SVGD ist. Dieses multifunktionale Gewebe schirmt bekanntlich die Intima und damit auch die tieferen Gefäßwandschichten vom vorbeiströmenden Blut ab [1,2,43,67]. Aufgrund seiner Einschichtigkeit, der geringen Festigkeit und - gerade in Venen - schwachen Verankerung in der übrigen Gefäßwand, ist das Endothel in der Folge der üblichen operativen Manipulationen, während der Explantation der Bypass-Segmente und der chirurgischen Abdichtung ihrer Seitenäste, sowie während der intraoperativen Lagerung und schließlich auch beim pulsierenden Anfluten des Blutes unter den ungewohnten arteriellen Druckverhältnissen, besonderen Belastungen ausgesetzt. Diese Tatsache sollte den Herzchirurgen alarmieren, da das Endothel durch anti-aggregatorische, anti-koagulatorische sowie pro-fibrinolytische Aktivität physiologischerweise bekanntlich ständig für das Flüssigbleiben des Blutes im Kreislaufsystem sorgt [43], während es beim Kontakt mit verletztem Gewebe rasch thrombosiert. Auch der Zusammenhang zwischen geschädigtem Endothel und Arteriosklerose ist schon lange bekannt. Trotzdem geht man bei routinemäßigen koronaren Bypassoperationen in aller Regel recht unbesorgt mit den explantierten Gefäßen um. Vielleicht auch deshalb, weil trotz des Wissens um verschiedene subendotheliale Zellarten mit pathogenetischer Potenz und der Aufklärung vieler biochemischer Vorgänge im Bereich arteriosklerotischer Läsionen [21,46], ein unbedingtes Postulat zur Schonung des Gefäßendothels noch nicht gefäßchirurgisches Allgemeingut ist. Wahrscheinlich hängt das auch damit zusammen, dass bisher noch kaum verstanden ist, warum eine Verletzung von Gefäßendothel sofort zum Verschluss von Grafts durch Fibringerinnsel führen kann [52,62], warum sich im mittleren bis langfristigen Verlauf proliferativ bedingte Gefäßstenosen

entwickeln [11,23] und warum gerade im Bereich des proliferierenden und dann schließlich rupturierenden Wandgewebes plötzliche Thrombosierungsprozesse einsetzen können, die häufig das Leben der betroffenen Patienten sofort beenden [7,28,40,68].

Eine genauere Erforschung der intimalen Gewebestruktur und ihrer physiologischen sowie pathophysiologischen Funktionen lässt auch tiefere Einblicke in die Pathogenese wichtiger Gefäßwanderingerkrankungen, wie z.B. der intravasalen Thrombose, der Arteriosklerose, oder der oben erwähnten „saphenous vein graft disease“ erwarten. Eine pathologisch veränderte Intima gilt jedenfalls schon lange als Ursprung dieser gravierenden Gefäßerkrankungen [8,48]. Die Entdeckung eines subendothelial in der Intima angeordneten Netzes aus intimalen Perizyten [33] erscheint in diesen Zusammenhängen als ein wichtiger Meilenstein. Die schlechte Prognose gerade von koronaren Bypassgefäßen venösen Ursprungs legt auf dieser Grundlage nahe, dass im Rahmen der üblichen chirurgischen Präparationsmaßnahmen das Endothel der Blutgefäßsegmente besonders stark geschädigt wird, sodass es bei der anschließenden Reperfusion der transplantierten Bypasssegmente zur Exposition der intimalen Perizyten und damit zu den gefährlichen thrombotischen Prozessen kommt, welche die - sich dann akut verschlechternde - klinische Prognose bestimmen [52]. Die in der Arbeitsgruppe um Prof. Nees am Physiologischen Institut der LMU durchgeführten Untersuchungen zur anatomischen und funktionellen Integrität der Gefäßintima von Arterien und Venen haben mich in diesem Zusammenhang sehr interessiert. Quantitative Nachweisverfahren zur Ausmessung des Endothelialisierungsgrades solcher Bypassgefäß-Präparate und systematische hämostasiologische Untersuchungen zu ihrer Thrombogenität - wichtige Grundlagen für eine erfolgversprechende Korrelation von Intimaschädigung mit ihrer eventuell resultierenden Thrombogenität - waren bisher in der Literatur unbekannt.

Vor diesem Hintergrund haben sich in vorbereitenden Gesprächen und während eigener Literaturstudien die folgenden Zielsetzungen der vorliegenden Dissertationsarbeit entwickelt:

1. Etablierung konfluenter Gewebefilme von Endothelzellen aus humaner V. saphena in Reinkultur in Petrischalen und im „Transwell-Kultivationsystem“
2. Mikrokinematographische Beobachtung des Verhaltens gezüchteter Endothelzellen während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße

3. Messung der Wasserdurchlässigkeit von konfluentem venösen Endothelgewebe während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße
4. Exemplarische Inspektion der Intimaoberfläche von Reststücken venöser Bypass-Segmente aus humanen V. saphena Gefäßen nach Silberimprägnierung.
5. Pilotmäßiger Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades
6. Messung der Aktivierung von Gerinnungsfaktor X in der V. auricularis des Schweineohres und in humanen V. saphena - Reststücken koronarer Bypassoperationen

2 Materialien

2.1 Verbrauchsmaterialien

- sterile Kunststoffpipetten zum Aufnehmen von Zellsuspensionen (einzeln verpackt) Größen: 2, 5, 10, 25 ml; sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml (Cat.No.2096), 50 ml (2070); Zellkulturschalen \varnothing 40 mm, 9,6 cm² (3001), \varnothing 60 mm, 19,6 cm² (3004); Multiwellplatten mit Cell culture insert[®]; Falcon Becton Dickinson, Heidelberg
- Glaskulturschalen Steriplan[®] : Schott, Mainz
- Transwell-Filtereinsätze entsprechender Zellkultursysteme (mit fetalem Serumalbumin beschichtete Polyester Transwell Einsätze mit einem Porendurchmesser von 0.4 μ m und einer Porendichte von 108/cm²: Corning Incorporated, USA
- Pipettenspitzen für 10, 100, 1000, 2500 μ l Eppendorf-Pipetten: Eppendorf, Hamburg
- PP-Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml): Eppendorf oder Biozym, Hessisch Oldendorf
- Spritzenaufsatz-Sterilfilter sowie Membranfilter (0,2 μ m Poren- \varnothing) für Flaschenaufsatzfilter: Sartorius, Göttingen
- Flaschenaufsatzfilter (Bottle Top Filter Unit): Nalgene, Rochester, USA
- Sterile Einmalspritzen und Kanülen: Braun, Melsungen
- Cryotubes: Nunc, Wiesbaden
- Fotomaterial: Ilford Pan F Plus 50 Black and white, Kodak Elite Chrome Extra Colour 100 (EBX)
- Assay Plate; 96 Well, Flat Bottom, Polystyrene: Corning Incorporated, USA
- Präparationsbesteck
- Fogarty Gefäßklemmen; Softjaw Spring Clips: Edwards Lifesciences, USA
- chirurgischer Nadelhalter
- 3-Wege-Hähne; Discofix: Braun, Melsungen
- Butterfly-Kanülen, verkürzt und abgestumpft, Venofix (0,80 mm \varnothing , 10 mm Länge): Braun, Melsungen
- Kanülen, verkürzt und abgestumpft (Sterican 0,80 mm \varnothing , 10 mm Länge): Braun, Melsungen
- Paperclips in verschiedenen Größen
- Gefäßkanüle 30004: Medtronic, Meerbusch

- Ligatur-Nähte und Klappennaht-Set; Ethibond 4/0 und Ethibond Excel EH7713L: Ethicon, Norderstedt

2.2 Chemikalien

- Gase und Gasgemische: CO₂; Carbogen (95% O₂, 5% CO₂); 95% N₂, 5% CO₂. Linde, München
- Wasser zum Ansetzen von Lösungen wurde aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore Q mit einer Liqui Pure 1 Cartridge (USF) gewonnen.
- Feinchemikalien:
 - Albumin, bovin (Init. fract. by cold alc. precip. Fraction V), Albumin, bovin (Protease-free; prepared from pasteurized serum; initial fractionation by cold alcohol precipitation, approx. 99%),: Sigma, St.Louis, USA / Deisenhofen
 - Dispase II, Kollagenase D: Roche, Grenzach-Whylen (ehem. Boehringer Mannheim)
 - Ethanol 99% (verg. mit 1% Methylethylketon), HEPES-Na (>99,5%), Osmiumtetroxyd 4% in H₂O (99,9%), Glutaraldehyd, RBS 35[®]: Carl Roth, Karlsruhe
 - Trypsin (aus Rinderpankreas 3,60 U/mg), HEPPSO: Serva, Heidelberg
 - Thromborel S[®]: Dade Behring, Marburg
 - Octaplex 500[®] (Prothrombinkomplex mit Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X): Octapharm, Langenfeld
 - S-2222: Chromogenix/Haemochrom Diagnostica, Essen
- Reagentien für die Histologie
 - Anti-human von Willebrand Factor sheep, FITC-conjugate, anti-human CD 68 mouse mAb 514H12: Serotec, Kidlington, GB
 - Anti CD 14 rabbit polyclonal: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
 - Anti tissue factor mouse mAb (Cat. No. 4509), rabbit pAb (Cat.No. 4502) American Diagnostica, Greenwich, USA
 - Anti- α -smooth muscle actin mAb clone 1A4, mouse ascites IgG, Cat.No. A2547; Anti- α -smooth muscle actin mAb clone 1A4, FITC Konjugat Cat.No.

- F3777; Anti vWF rabbit IgG Cat.No. F3520; Monoclonal rat anti-mouse kappa light chains Clone EM-34.1 Cat.No. K2132; anti-mouse IgG (Cat.No. A3562) und anti-rabbit (Cat.No. A3812) AP-Konjugat; 2-(4-Amidinophenyl)-6-Indolcarbamidin Dihydrochlorid (DAPI), TRITC-Dextran: Sigma, Deisenhofen
- Anti-mouse IgG Alexa Fluor 350, 488 und 546, Anti rabbit IgG Alexa Fluor 488 und 546, Anti goat IgG 546, Anti rat IgG 546; SYTOX[®] Green; DilacLDL; SlowFade[®] Light Antifade Kit, ELF[®] 97 Endogenous Phosphatase Detection Kit: Molecular Probes, Eugene, USA
 - Jung tissue freezing medium[®], Leica Instruments, Nussloch
 - Alle weiteren Chemikalien wurden durchweg in p.a.-Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.
 - Stammlösungen für die Zellkultur
 - DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Glutamin, Natrium Pyruvat, 1 g/l Glucose und Pyridoxin) Cat.-No. 31885-023; Medium 199 (mit Earle's Salt, 2,2 g/ml NaHCO₃, und L-Glutamin) Cat.-No.31150-022; Medium 199 mit 25 mM HEPES (mit Earles's Salts und L-Glutamin) Cat.-No.22340-020; Pen-Strep (10.000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin); fetales Kälberserum Cat.-No.10270-106: Gibco / Invitrogen Karlsruhe
 - Medium 199 (mit Earle's Salt ohne Glutamin) Cat.-No. M2154 Sigma, Deisenhofen
 - Endothelial cell growth medium (ECCM): Promocell, Heidelberg

2.3 Lösungen

- PBS: 142 mM NaCl, 5 mM KH₂PO₄; mit NaOH auf pH 7,40 eingestellt, durch Faltenfilter in Glasflaschen filtriert und autoklaviert.
- Krebs-Ringer-TRIS (KRT): 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 50 mM TRIS, 0,1% BSA, 8,3 mM Glucose, 2 mM Pyruvat, 11,4 mM Kreatin, 20 mM Taurin, 5 mM Ribose, 2 mM L-Asparaginsäure, 2 mM L-Glutamin, 1 mM

L-Arginin, 0,5mM Harnsäure; mit HCl eingestellt auf pH 7,40; Vorfiltration und Sterilfiltration

- Präservationslösungen:

- *Biseko*: Biotest, Dreieich
- *Saline /Albuminlösung*: 5% Humanalbumin in physiologischer NaCl Lösung: Biotest, Dreieich
- *kardioplegische Lsg. nach H .J. Bretschneider*: 15 mM NaCl, 10 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 15 µM CaCl₂, 1 mM α-Ketoglutarinsäure, 198 mM L-Histidin, 2 mM L-Tryptophan, 30 mM Mannitol: Biotest, Dreieich
- *physiologische NaCl Lösung*: 154 mM (0,9%) NaCl

- Lösungen für Zellkultur:

- *Transportmedium*: 500 ml DMEM, 50 ml 200 mM HEPES, adultes Schweine Serum auf 10% Endkonzentration, 14 ml Pen/Strep (10,000 U/ml Penicillin G und 10,000 µg/ml Streptomycin), 500 I.E. Heparin, 0,01 mM Papaverin
- *DMEM-10*: Auf 0,5 l DMEM: 12 ml Antibiotikallösung (Stammlösung: 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), Glutamin ad 3 mM Endkonzentration, fetales Kälberserum ad Endkonzentration von 10 %
- *Promocell / DMEM*: Endothelial cell growth medium (ECCM) der Firma Promocell wurde mit den mitgelieferten Zusätzen versehen. Dieses Medium wurde auf 10 % FCS ergänzt und im Verhältnis 1 : 1 mit DMEM-10 gemischt.
- *Proteasegemisch* zur Zellisolierung: Dispase II und Kollagenase D in einer Konzentration von je 0,09% in Ca-freiem, mit Rinderserumalbumin 0,9%ig (w/v) angereichertem KRT-Medium

- Lösungen für die indirekte Bestimmung von Gewebefaktorkonzentrationen:

- *Octaplex-Stammlösung*: auf 60 I.E./ml Faktor X entsprechend eingestellt, hieraus ergaben sich, je nach Charge im Mittel: Faktor II 73,2 I.E./ml; Faktor VII 45,4 I.E./ml; Faktor IX 65,9 I.E./ml
- *KRT-Octaplex Lösung*: KRT mit Octaplex ad 2 I.E./ml Faktor X Endkonzentration und mit 400 ng/ml Faktor VII_a
- *Faktor X_a-Substratlösung* 0,1%ig in H₂O (Farbstoff S-2222, Chromogenix)
- *Thromborel S*® : DADE Behring, Marburg

- *Stoppuffer*: 50 mM TRIS, 100 mM EDTA, 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, mit HCl eingestellt auf pH 10,0; Vorfiltration und Autoklavierung
- Lösungen für die Histologie:
 - *FA-PBS*: 1 Teil der 37%igen Formaldehyd-Stammlösung, 9 Teile PBS
 - *Karnowsky-Fixativ*: 2% Formaldehyd (aus Paraformaldehyd durch kurzes Erhitzen auf 60-70°C in 50 mM NaOH frisch angesetzt) und 2,5% Glutaraldehyd (w/v) in 100 mM Na-Cacodylatpuffer, pH 7,4
 - *Silbernitrat-Lösung*: 0,2%ig in Wasser
 - *Glucoselösung*: 5%ig in PBS
 - *0,1 M Natriumphosphat-Puffer*: pH 7,4

2.4 Geräte

- Autoklav National Steril-Quick 704-9000-D: Heinike, USA
- Brutschrank Funcionline: Heraeus, Hanau
- Eppendor fzentrifuge 5412: Eppendorf, Hamburg
- Herasafe Sterilbank, Heraeus, Hanau
- Lichtmikroskope: Axiovert 35 mit Digitalkamera; Axiovert 200 M mit Digitalkamera und Computersteuerung durch Software AxioVision 3.0.6.: Zeiss, Göttingen;
- MRX Microplate Reader und Software Dynex Revelation Version 4.0.6., Dynatech Laboratories Denkendorf;
- Rasterelektronenmikroskop Jeol JSM 35 CF, Jeol, Japan; mit CO₂-Kritisch-Punkt-Trocknungsgerät Balzer CPD 020, Baltec, Walluf; sowie Goldbedampfungsgerät Polaron E 5000 Dioden-Sputter, Plano, Marburg;
- Wasserbadschüttler Model 676, New Brunswick Scientific, USA;
- Wärmeplatte PZ 28-1

3 Methoden

Alle verwendeten Venensegmente (Reststücke nach koronaren Bypass-Operationen) wurden in enger Kooperation mit Herrn Prof. Dr. M. B. Kemkes und Frau Dr. B. Gansera (Klinikum München Bogenhausen, Klinik für Herzchirurgie) erhalten, die dafür die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission eingeholt hatten. Experimente an diesem menschlichen Gewebematerial wurden also nur nach schriftlicher Einwilligung der Patienten und in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki aus dem Jahre 1964 (bzw. allen ihren nachfolgenden Ergänzungen) zur Durchführung biomedizinischer Studien an menschlichen Patienten bzw. deren Geweben und/oder Organen durchgeführt.

3.1 Etablierung konfluenter Gewebefilme von humanen Endothelzellen venösen Ursprungs (V. saphena) in Reinkultur in Petrischalen sowie im „Transwell – Kultivations-System“

Frisch erhaltene Reststücke koronarer Venenbypass-Segmente wurden in sterilem Transportmedium unter Eiskühlung ins Labor transportiert. Nach Spülen mit Ca-freiem Krebs-Tris-Medium und Anwärmung auf 37 °C konnte das luminale Endothel nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C mittels eines speziell optimierten Proteasegemischs von der restlichen Gefäßwand abgelöst werden. Nach dem Abspülen (via Pipette oder Infusionsspritze) der Endothelzellen mit Ca-freiem Krebs-Tris-Medium wurden sie zweimal mit ECCM durch Zentrifugation gewaschen und in ECCM zur Aussaat in Petrischalen homogen suspendiert. Die Kultivation im Brutschrank unter Standardbedingungen erfolgte in Falcon Petrischalen oder auf den porösen Transwell-Filtereinsätzen entsprechender Zellkultursysteme (mit fetalem Serumalbumin beschichtete Polyester Transwell Einsätze mit einem Porendurchmesser von 0.4 µm und einer Porendichte von 10⁸/cm² der Firma Corning, NY, USA).

3.2 Histologische Techniken

Fixierung

Zellkulturen wurden für immunohistochemische Untersuchungen 2 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung von 0.5% Glutaraldehyd (GA) und 4% Paraformaldehyd

(PA) in PBS vorfixiert, über Nacht in PA bei 4°C durchfixiert, mit 1%iger Lösung von Triton X-100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert, mit PBS gewaschen, und dann für 10 Minuten mit einer 1%igen wässrigen Lösung von Natriumborhydrid (NaBH_4) inkubiert, um freie Carbonylgruppen zu reduzieren.

Venensegmente wurden unter einem transmuralen Druckgradienten von 100 mmHg mit der oben genannten Fixierungslösung gefüllt und für mindestens 2 Stunden inkubiert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden sie wie eben beschrieben permeabilisiert, dieser Schritt wurde aber nicht vollzogen bei allen Venenenpräparaten, die einer Silberkontrastierung unterzogen werden sollten.

Die Fixierung für rasterelektronenmikroskopische Zwecke erfolgte standardmäßig während 12h in 2,5 %iger (w/v) gepufferter Glutaraldehydlösung in PBS.

Nachbearbeitung von fixierten Venensegmenten

Nach der oben beschriebenen Fixierung wurden Venensegmente in 0,15 molare NaCl-Lösung überführt und mindestens 12 Stunden in dieser Lösung inkubiert. Dies sollte eine vollständige Durchsetzung aller Wandschichten mit den Na- und Cl-Ionen sicherstellen, was vor allem im Hinblick auf eine spätere spezifische Darstellung der Interzellularfugen mittels Silbernitratfärbung wichtig war. Die einzelnen Venenstücke mussten außerdem vor den Färbungsschritten von der Adventitia aufliegenden Blutkoageln und dickeren Bindegewebsschichten befreit werden, was sich erst im Verlauf der Untersuchung herauskristallisierte. Weiterhin war es notwendig die Segmente in longitudinaler Ausrichtung zu halbieren, ohne dabei die luminale Seite durch die verwendeten Instrumente zu verletzen. Dies erfolgte daher unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops oder einer Lupe. Die Hälften wurden daraufhin bis zur Färbung wieder in NaCl-Lösung überführt.

Färbungsverfahren

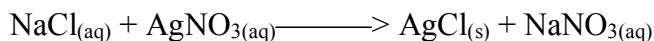
Immunhistochemie

Die Proben wurden mindestens 3 Stunden mit einer geeigneten Verdünnung des jeweils verwendeten Primärantikörpers (PBS mit Zusatz von 0,1% bovinem Serumalbumin) bei 37 °C inkubiert. Hierauf wurde mit 0,1%igem Triton in PBS gespült, dann für 4 Stunden mit Sekundärantikörpern erneut bei 37 °C inkubiert und zuletzt ausgiebig mit PBS gespült. Für Doppel- oder Dreifachfärbungen wurden diese Prozeduren mit anderen Primärantikörpern und

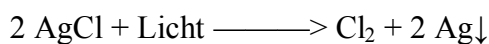
den entsprechenden Sekundärantikörpern wiederholt. Die Negativ-Kontrollen wurden durch Weglassen des Primärantikörpers für jedes Protokoll und für jeden Antikörper durchgeführt. Für Fluoreszenzaufnahmen stand ein umgekehrtes Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe und Filtersätzen für drei Anregungsbereiche zur Verfügung: „DAPI-Bereich“ (365 nm), „Fluorescein-Bereich“ (450-490 nm), „Rhodamin“-Bereich (546 nm).

Silberkontrastierung von endothelialen Zellgrenzen

Das Prinzip der hier angewandten Färbemethode besteht darin, dass nur die Zellgrenzen zwischen den einzelnen Endothelzellen angefärbt werden. Nach Inkubation der Venen in NaCl- Lösung und kurzem Abwaschen der Venen mit 5%iger Glucose Lösung finden sich Cl- Ionen luminal nur noch zwischen den Endothelzellen, also im Bereich der Zellfugen, da die lipophile, nicht permeabilisierte Plasmamembran der einzelnen endothelialen Zellindividuen eine wirksame Barriere für diese Ionen bildet. In den Zellzwischenräumen gelangen die Ionen durch Diffusion dagegen an die luminale Oberfläche, verbinden sich dort beim Eintauchen des Venenstückes in eine Silbernitratlösung mit den Silberionen und fallen sofort als schwerlösliches Silberchlorid aus.



Analog zu photographischen Prozessen, entsteht während Belichtung in Abhängigkeit der eingesetzten Lichtintensität, metallisches Silber aus AgCl, welches zunächst lila, dann blassviolett und schließlich schwarzbraun imponiert:



Zweckmäßigerweise wurden die einzelnen Venensegmente nach ihrer Präparation und Äquilibration mit PBS in folgende Lösungen getaucht:

1. Drei bis fünf Sekunden in 5%iger Glucose Lösung;
2. 15 bzw. 30 Sekunden in 0,2%iger in AgNO₃ Lösung;
3. zweimal jeweils fünf Sekunden in zwei separate Gefäße mit 5%iger Glucose-Lösung.

Nach dieser Prozedur wurden die Proben zehn Minuten in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer gelagert.

Die gefärbten Segmente wurden nun vorsichtig zwischen zwei mittels dauerelastischer Silikonstreifen (Terostat, Wackerchemie, Burgau) auf Abstand gehaltene Objektträgern eingespannt, wobei 80%ige Glyzerinlösung als Einbettungsmittel verwendet wurde.

Die Belichtung erfolgte unter einer 500 W Tageslichtlampe in 40 cm Abstand auf Eis über einen Zeitraum von ca. 15-45 Minuten.

Nach der Färbung wurden die Bilder über ein Durchlichtmikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss begutachtet, ausgewertet und mittels einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera dokumentiert.

Die Auswertung der Bilder bezüglich des Endothelialisierungsgrades erfolgte mittels computerunterstützter Planimetrie wie im Resultatteil berichtet wird.

Rasterelektronenmikroskopie

Nach wiederholtem Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung wurden die zuvor in Glutaraldehydlösung fixierten Proben (s. oben) in 1%iger Osmiumtetroxydlösung (in 100 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,7) gewaschen. Im Anschluss an diese Prozedur wurden die Proben mit destilliertem H₂O gewaschen und durch Überführen in Ethanol-Bäder in aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) entwässert, ehe sie am kritischen Punkt von CO₂ getrocknet wurden.

Die getrockneten Proben wurden nun auf Leit-Tabs (Fa. Plano) befestigt und durch Aufdampfen einer dünnen Goldschicht leitfähig gemacht.

Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Präparate unter einer Beschleunigungsspannung von 15 kV beobachtet und konventionell photographiert (Schwarzweißfilm Ilford FP4 Plus). Unterstützt wurden diese Arbeiten von Herrn E. Thielcke, Mitarbeiter der Anatomischen Anstalt der LMU München.

3.3 Mikrokinematographische Beobachtung des Verhaltens gezüchteter Endothelzellen während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße

Endothelzellkulturen, die in Petrischalen zur Konfluenz gezüchtet worden waren, wurden in eine, in der Arbeitsgruppe Prof. Nees entwickelte, Inkubationskammer zur Beobachtung lebender Gewebe auf dem Tisch eines Zellkulturmikroskops (Zeiss-Axiovert 200) eingebracht und bei Standardkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre) beobachtet. Mittels eines selbst optimierten Deckels konnte der Wechsel der Inkubationsmedien von außen her unter weitgehend sterilen Bedingungen durchgeführt werden (s. Abb. 4, Kap. 4.2. Ergebnisteil, S. 28). Das zeitabhängige Verhalten der

gezüchteten Zellen in bestimmten Inkubationsmedien wurde durch Serienmikrophotographie (Zeiss AxioCam Color, 1 Aufnahme / gewähltem Zeitintervall) dokumentiert, wobei dafür sowie auch zur Herstellung von Zeitrafferfilmen im AVI-Format die entsprechende Software des Mikroskopherstellers (Zeiss AxioVision Rel 4.5 SP1) eingesetzt wurde.

3.4 Filtrierbarkeit von Bypass-Präservationslösungen über konfluente venöse Endothelschichten während der Inkubation mit verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße

Die Messung der Filtrierbarkeit von Präservationslösungen über konfluente venöse Endothelschichten erfolgte durch Einsatz eines einfachen Messsystems zur gravimetrischen Bestimmung von Flüssigkeitstransporten durch konfluente Endothelschichten, die zuvor auf porösen Transwell-Membranen angezüchtet worden waren. Weitere Einzelheiten hierzu sind dem Inset bzw. der Legende zu Abb. 6 (s. Kap. 4.3. Ergebnisteil, S. 31) zu entnehmen.

3.5 Exemplarische Inspektion der Intimaoberfläche von Reststücken venöser Bypass-Segmente humaner V. saphena Gefäße (gewonnen während koronaren Bypassoperationen) nach Silberimprägnierung unter pilotmäßigem Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades

Insgesamt wurden zwischen Januar 2004 und April 2006 Venensegmente von 83 Patienten untersucht, die sich erstmalig einer elektiven koronaren Bypassoperation unterzogen hatten. Für alle Patienten wurden die linke und rechte A. mammaria an prominenten koronaren Positionen eingesetzt, alle weiteren Bypässe wurden mit V. saphena Segmenten durchgeführt. Ausschlusskriterien für die Einschleusung in die hier beschriebenen Untersuchungen umfassten schwere Varikosis und Venendurchmesser < 2.5 mm (aus histologisch-präparativen Gründen).

Die Venenexplantation erfolgte durch die kooperierenden Herzchirurgen so vorsichtig wie möglich, um die Venen nicht mechanisch zu beschädigen. Reststücke (3–8 cm lang, $\varnothing > 2.5$ mm) davon wurden an beiden Enden kanüliert (Medtronic 30004), ihre Seitenäste wurden mit 4/0 Nahtmaterial ligiert. Die Dichtigkeitsprüfung erfolgte bei ca. 200 mmHg mittels einer Spritze, die mit dem jeweils ausgewählten Präservierungsmedium (Saline,

Saline/Albuminlösung mit 5%igem (w/v) humanem Serumalbumin, HTK (Bretschneider)-Lösung oder Biseko gefüllt war, unter gleichzeitigem Verschluss des proximalen Gefäßendes. Anschließend wurde das jeweilige Segment mit der betreffenden Präservierungslösung gespült und in diese bei Raumtemperatur für etwa 45 Minuten eingelegt. Nach dieser Inkubationsperiode wurden Gefäßsegmente mit Gewebekulturmedium (DMEM + 10% FCS + 10 I.E./ml Heparin) kurz gespült und in diesem Medium unter Eiskühlung ins Labor transportiert. Dort erfolgte sofort die histologische Fixierung mit dem beschriebenen Fixativ unter einem hydrostatischen Gegendruck von 100 mmHg und anschließend die Silberimprägnierung wie in Kap. 3.2. beschrieben.

Über das Bildbearbeitungsprogramm Photoshop 7.0[©] von Adobe erfolgte die Auswertung sowie die vorhergehende Bearbeitung der Aufnahmen von den silberimprägnierten V. saphena - Reststücken.

Die Grundlage der digitalen Bildauswertung waren so genannte Panoramabilder, welche aus Fotoserien, über die gesamte Länge der einzelnen druckfixierten Venenstücke gebildet wurden. Um eine fortlaufende Fotoserie der Intima zu erhalten, musste der linke Bildrand des aktuell anzufertigenden Bildes in etwa denselben Bildabschnitt beinhalten wie der rechte Rand des vorhergehenden Bildes. Durch das sinnvolle Übereinanderlagern der einzelnen Fotos einer Serie anhand ausgewählter Merkmale wurde die Basis für die Panoramabilder der Präparate gelegt. Diese sehr großen Panoramabilder, im Schnitt aus zehn Einzelfotos bestehend, eigneten sich zwar sehr gut, um einen Eindruck der intimalen Verhältnisse über die normalerweise nur sehr kleinen Ausschnitte hinaus zu vermitteln, stellten sich aber als ungünstig im Handling während der vorbereitenden Bildbearbeitung zur digitalen Planimetrie heraus. Aus diesem Grund wurden die großen Bilder in kleine Abschnitte entsprechend der Größe von ungefähr 3 – 4 Einzelfotos aufgeteilt und so weiterbearbeitet.

Daraufhin erfolgte eine teils sehr aufwendige Bildbearbeitung mit dem Ziel Bildabschnitte graphisch so zu bearbeiten, dass sie danach durch das verwendete Bildbearbeitungsprogramm Photoshop richtig „ausgewertet“ wurden. Es mussten also diverse histologische Merkmale und Phänomene sowie Färbesonderheiten bzw. Artefakte von Seiten des Auswerterers erkannt, beurteilt und mit den graphischen Werkzeugen und Funktionen des Programmes dahingehend bearbeitet werden, dass die für Photoshop nicht eindeutig richtig zuordenbaren Areale der intimalen Abbildungen (hell / weiß für endothelialisierte Areale; dunkel / schwarz für fehlendes bzw. geschädigtes Endothel) nach der Bearbeitung - entsprechend ihrer histologischen Beurteilung durch den Experimentator - eindeutig zugeordnet werden konnten. Diese Zuteilung erfolgte nach Anlegen eines Schwellenwertes, welcher jeden Bildpunkt der

Abbildung entweder der Farbe Schwarz oder Weiß zuordnete. Die vom Programm im Histogramm ermittelten Anteile der jeweiligen Farbe (gemessen in Pixel) wurden dann entsprechend der unten angegebenen einfachen Formel ins Verhältnis zur Größe des Gesamtbildes gesetzt und als Endotheldeckung in Prozent des Bildabschnittes angegeben.

$$\text{Endothelialisierungsgrad [\%]} = \frac{\text{Anzahl der weißen Bildpunkte}}{\text{Gesamtzahl der Bildpixel}} \times 100$$

3.6 Messung der Aktivierung von Gerinnungsfaktor X in der V. auricularis magna des Schweineohres

Die in diesem Abschnitt dargelegte Methodik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die speziellen experimentellen Erfordernisse ausgerichtet und wird deshalb im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Präparation von Schweineohren

Bereits im Schlachthof wurde eine Vorauswahl der verwendeten Ohren durchgeführt, wobei Wert auf folgende Kriterien gelegt wurde: eine gut erkennbare Vena auricularis des Tieres, mit möglichst wenigen bzw. keinen schon makroskopisch sichtbaren Seitenästen, sowie keine Strommarken oder sonstige Verletzungen am Ohr. Die Ohren des Schweines wurden unmittelbar nach der Betäubung mittels elektrischer Fasszange und Eröffnen der Aorta des Tieres abgetrennt. Daraufhin wurde der Ohrknorpel mit der enthaltenen Vene 2-2,5 cm zu den Rändern der Vene zurechtgeschnitten. In das distale Gefäßende wurde nun eine abgestumpfte Kanüle eingeführt und mit einer Fogarty Klemme abgedichtet. Über diese Kanüle wurde mit eisgekühltem *Transportmedium* das Blut aus der Vene gespült und anschließend befüllt, indem das proximale Gefäßende über eine zweite Klemme wurde. Diese Reihenfolge war wichtig, da natürlich auf die Einhaltung der physiologischen Flussrichtung geachtet werden musste.

Die befüllten Präparate wurden in einem Kunststoffbehälter, der auf Eis gelagert war, in einer Kühltasche schnellstmöglich ins Labor transportiert. Dies sollte degenerative Prozesse im Bereich der Venenwand und speziell der Endothelzellen während des Transportes und der Zeit bis zu den Versuchen so weit wie möglich unterbinden.

Vorbereitung der Venen im Labor

Im Labor wurden die Haut und das locker auf dem Knorpel aufliegende subkutane Bindegewebe im Bereich der jetzt zu entfernenden Kanülen bis auf den Knorpel abpräpariert und bei Bedarf der Knorpel noch näher zur Vene hin zugeschnitten (bis zu ca. 1,5 cm).

Anschließend wurden abgestumpfte Butterfly-Kanülen in das Gefäßlumen eingeführt und über die Flügel mit Fogarty-Klemmen am Schweineohr befestigt. Im Bereich hierzu angefertigter Einkerbungen an der Kanülenspitze wurde die Vene nun mit dem chirurgischen Nahtmaterial umbunden. (Abb.1c) Dabei wurde das Schweineohr zunächst mit der jeweiligen Nadel des Nahtsets an beiden Seiten der Vene gefäßnah durchstoßen und auf der venenfernen Seite mit den beiden Fadenenden ein Instrumentenknoten angelegt. Dieses Umbinden des Gefäßes diente weniger der Befestigung der Kanülen, als vielmehr der Abdichtung des Überganges zwischen Gefäß- und Kanülenlumen, was durch die Einkerbungen im Bereich der Kanülenspitze verbessert wurde. Zusätzlich wurden die Gefäßenden noch abgedichtet, indem Fogarty- Klemmen über der Naht und der Kanüle in der Vene angebracht wurden, um einen Verlust von Reaktionsflüssigkeit während des Versuchs und auch Volumenschwankungen bestmöglich schon beim Herstellen der Versuchspräparate zu verhindern. (Abb.1a)

Nachfolgend wurden 3-Wege-Hähne an den Butterfly-Kanülen angebracht, über welche die Venen nun wieder vorsichtig mit Medium via 20 ml Spritze luftblasenfrei befüllt und danach mit den Hähnen verschlossen wurden. Bei der Befüllung des Gefäßes musste zum einen natürlich erneut auf die physiologische Flussrichtung der Vene und zum anderen auf den Fülldruck, der nicht zu hoch sein durfte geachtet werden. Das Befüllen wurde daher folgendermaßen beendet. Nachdem das Gefäß luftblasenfrei gespült und mit Medium angefüllt worden war, wurde zunächst der proximale Hahn verschlossen und daraufhin, sobald ein Widerstand beim weiteren vorsichtigen Befüllen mit der 20ml Spritze zu spüren war, sofort der distale Hahn verschlossen.

Die durch den höheren Druck nun sichtbar gewordenen größeren Nebenäste wurden direkt durch abgangsnahes Abklemmen mittels passenden Paperclips verschlossen. Zusätzlich dazu wurden durch venennahes Anlegen von weiteren Paperclips über die gesamte Gefäßlänge eventuell vorhandene nicht sichtbare Nebenäste „blind“ abgedichtet. (Abb.1a, b)

Versuchsaufbau:

Die kanülierte Vene wurde bei Beginn des Versuchs mit ihrem distalen Ende über den 3-Wege-Hahn mit einem Silikonschlauchsystem verbunden, welches von unten in einen Vorratsbehälter mündete. Dieser Vorratsbehälter war mit der jeweiligen Präservationslösung gefüllt und auf einer relativen Höhe von 50 cm angebracht, wodurch die Füllung des Venenpräparates mit einem standardisierten Druck von ca. 37 mmHg erfolgte.

Die Metallkästen, in denen die Versuchspräparate während der Inkubation mit der Reaktionslösung aufbewahrt wurden, mussten einen ausreichenden Zeitraum vor Versuchsbeginn in ein auf 39 °C temperiertes Wärmebad gestellt werden. Um in den Metallkästen ein feuchtes Klima zu schaffen befand sich darin ein kleiner Behälter locker angefüllt mit in Wasser getränkten Papiertüchern. Der Boden der Kästen war dagegen mit trockenen Papiertüchern ausgelegt, sodass im Falle einer Undichtigkeit der Schweineohrpräparate der Austritt von Flüssigkeit sicher bemerkt wurde und die entsprechenden Konsequenzen daraus gezogen werden konnten.

Während des Versuchs lagerten der Stopppuffer, der Faktor VII_a, die KRT-Lösung, und die Octaplex Lösung alle bis kurz vor ihrem Einsatz auf Eis. Die beiden letztgenannten Substanzen wurden auch erst zu diesem Zeitpunkt im vorgeschriebenen Verhältnis (Octaplex: KRT; 1:30) vermischt. Diesem Gemisch wurde dann die entsprechend benötigte Menge an Faktor VII_a zugesetzt.

Zusätzlich lichtgeschützt lagerte die Faktor X_a-Substratlösung ebenfalls auf Eis.

Versuchsablauf:

Zu Beginn des Versuches musste das Transportmedium aus dem Versuchspräparat durch die jeweilige Präservationslösung ersetzt werden. Dies erfolgte durch Spülung und das anschließende Befüllen der Vene und der angeschlossenen 3-Wege-Hähne mit dem angelegten Druck von 50 cm Wassersäule. Nachdem die Vene gefüllt war, wurden die 3-Wege-Hähne geschlossen.

Während der 90-minütigen Inkubation mit der jeweiligen Präservationslösung bei Zimmertemperatur war eine regelmäßige Kontrolle der Druckverhältnisse in der Vene und ihrer Dichtheit notwendig, um undichte Stellen eventuell noch abdichten zu können und somit den etwaigen Verlust von Flüssigkeit für den Zeitpunkt der späteren Inkubation mit dem Reaktionsgemisch auszuschließen. Nach Ablauf der eineinhalb Stunden wurde das Versuchspräparat vorsichtig und blasenfrei mit einer ausreichenden Menge KRT - Lösung

von der Präservationslösung freigespült. Anschließend wurden über die 3-Wege-Hähne ca. 2 ml des KRT-Octaplex + Faktor VII_a Gemisches also der Reaktionslösung dem Präparat so zugegeben, dass es danach ausschließlich mit der Reaktionslösung angefüllt war.

Die gefüllten und dichten Venen wurden daraufhin in die auf 39 °C vortemperierte Metallbox überführt und dort eingeschlossen für 45 Minuten mit der Reaktionslösung inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurde durch Zugabe von KRT das Reaktionsgemisch aus dem Versuchspräparat herausgespült und ca. 1-1,5 ml davon in einem Eppendorf - Reaktionsgefäß aufgefangen, was die Probe darstellte. Dieses Volumen entsprach einem Vielfachen des Venenvolumens inklusive der angeschlossenen Kanülenvolumina, sodass ein Verbleib von Reaktionslösungsresten im Venenpräparat ausgeschlossen werden konnte.

Von dieser Probe wurde zunächst das exakte Gewicht mittels einer Feinwaage bestimmt, indem man vom Gesamtgewicht das zuvor ermittelte Gewicht des Reaktionsgefäßes subtrahierte. Mit diesem Wert konnte man über die Dichte von Wasser einfach das Probenvolumen errechnen.

Aus dem Probenvolumen wurden nun 200 µl entnommen und mit 70 µl eisgekühltem Stopppuffer versetzt. Das Gemisch wurde eine Minute hochtourig abzentrifugiert und 50 µl des Überstandes entnommen. Dieses Aliquot wurde auf die Assay Plate überführt und dort wurden ihm noch 50 µl Faktor X_a - Substratlösung (S-2222) zugeführt.

Die Messung mit dem MRX Microplate Reader, der in 30 Sekunden Abständen automatisch 30 Exstinktionsmessungen bei einer Wellenlänge von 405 nm durchführte, wurde darauf umgehend begonnen.

Diese Messungen wurden stets parallel an zwei 50 µl Aliquots der identischen Venenpräparate durchgeführt, um später bei der Auswertung den Mittelwert zu bilden.

Bestimmung der Blankwerte und der Referenz- bzw. Nullwerte:

Die so genannten Blankwerte wurden bei jeder Messung analog zu den normalen Werten gebildet, wobei die Inkubation der Reaktionslösung jedoch in einem inerten Eppendorf Versuchsgefäß anstatt in einem Venenpräparat vollzogen wurde.

Die Referenz- bzw. Nullwerte bei dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls sehr ähnlich zu den regulären Versuchswerten gebildet. Nachdem das Transportmedium mit KRT – Lösung aus dem Präparat gespült worden war, wurden die Venen aber hier sofort mit der Reaktionslösung

inkubiert, ohne dass zuvor die Inkubation mit einer der Präservationslösung erfolgte. Das weitere Vorgehen erfolgte dann analog zu den regulären Messungen.

Bestimmung des apparativen Totvolumens (in den Anschlüssen):

Die Volumina der verwendeten Kanülenpaare inklusive der angeschlossenen 3-Wege-Hähne wurden durch Wiegen exakt bestimmt. Dabei wurden die beiden Kanülen über einen Gummipfropfen dicht miteinander verbunden (Abb.1h). Daraufhin ist deren exaktes Gewicht vor und nach Füllung mit Wasser bestimmt worden. Über diese Differenz und die bekannte Dichte des Wassers konnte das Volumen exakt ermittelt werden.

Volumenbestimmung der untersuchten Schweineohrenvene mittels Evans Blue:

Nach Abschluss der intravasalen Faktor Xa Messung wurden die Venen mit 0,02%iger (w/v) Evans - Blue Lösung per Spritze über den 3-Wege-Hahn analog zur Gewebefaktor Messung zunächst gespült und dann quantitativ befüllt. Daraufhin wurden über den zuführenden 3-Wege-Hahn 2 ml 5%ige Humanalbuminlösung aus einer Spritze zugegeben und gleichzeitig über den anderen Hahn 2 ml in eine weitere Spritze aus dem Präparat abgesaugt. Diese Prozedur wurde sooft wiederholt bis die 2 ml Humanalbuminlösung und die Evans – Blue Lösung aus der Vene gleichmäßig vermischt waren. Von diesem Gemisch wurde ein 100 µl Aliquot entnommen und auf eine Assay Plate überführt. Unter Zuhilfenahme des MRX Readers wurde die Exstinktion des Aliquots bestimmt. Von diesem Wert musste nun nur noch der vorher bereits ermittelte Wert für die verwendete Humanalbuminlösung subtrahiert werden. (Abb.1e-f)

Mit den uns nun bekannten Daten konnte das Venenvolumen V_1 nach folgender Formel errechnet werden:

$$V_{Vene} = \left[\frac{V_0 \cdot (E_M - E_0)}{E_1 - E_M} \right] - V_{Anschlüsse} \quad (1)$$

wobei: E_1 = Exstinktionswert der 0,02%igen Evans-Blue Lsg.

E_0 = Exstinktionswert des 5%igen Humanalbumins

E_m = Exstinktionswert der Probe

V_0 = Volumen der Verdünnungslösung

$V_{Anschlüsse}$ = Volumen der Kanülen inklusive 3-Wege- Hähne

Diese Formel lässt sich auf folgende Überlegung zurückführen. Das Verhältnis vom Venenvolumen (V_1) zum Volumen der Verdünnungslösung (V_0) und das Verhältnis der verschiedenen Exstinktionen kann in folgender Gleichung beschrieben werden:

$$V_1/V_0 = (E_m - E_0)/(E_1 - E_m) \quad (2)$$

Diese Gleichung musste nun einfach nach V_1 aufgelöst werden, wobei Gleichung (1) entsteht.

Quantifizierung der intravasalen Bildung von Faktor Xa in der großen Ohrvene von Schweineohrpräparaten

Aus den Exstinktionswerten der einzelnen Versuche, ermittelt aus dem S-2222-Zefall innerhalb des linearen Bereiches bis zu einem Wert von 0,6 OD, wurde die Steigung der Werte errechnet. Von all diesen Steigungswerten wurde der Steigungswert der Blank Exstinktions-Werte subtrahiert.

Über eine Standardgerade konnten die Steigungswerte der Exstinktionen in die Menge aktivierten Faktor X umgerechnet werden. Die Steigung dieser Standardgerade stellt den Mittelwert der Steigungen aus einer Vielzahl von Verdünnungsreihen dar, in denen die verwendete Reaktionslösung durch die Zugabe von Thromboplastin (Dade Inovin) vollkommen durchaktiviert wurde. Das durchaktivierte Gemisch enthielt dabei 217 nM aktivierten Faktor X. Der Reaktionspuffer wurde nun in 1:5 Schritten weiter mit KRT - Lösung verdünnt und analog wurden mit dem Reader die entsprechenden Exstinktionssteigungen der einzelnen Verdünnungsstufen ermittelt. Zusammen mit der bekannten Faktor X_a Konzentration in den einzelnen Verdünnungsstufen konnte man die Steigungswerte der verschiedenen Verdünnungsreihen bestimmen.

Mit der Steigung dieser Standardgeraden konnte man von der bis jetzt ermittelten optischen Durchlässigkeit der Proben auf die darin enthaltene Faktor X_a Konzentration zurückschließen.

Der Messpuffer in der Vene wurde bei der Probenentnahme auf ein genau bestimmtes Endvolumen verdünnt. Anhand der Evans-Blue-Volumenmessung wurde das Volumen der Vene bestimmt. Damit ließ sich der Verdünnungsfaktor bestimmen, mit welchem der Wert der ermittelten Faktor X_a Menge multipliziert werden musste, um die Faktor X_a Menge in der Messflüssigkeit im Venenlumen zu erhalten. Die Vene war während des Versuchs 45 Minuten mit der Reaktionslösung angefüllt, also musste der Wert im nächsten Schritt durch 45 dividiert werden, damit er nun die Konzentration des Faktor X_a pro Minute umschrieb, die aus dem Faktor X aktiviert wurde.

Aufgrund der Längenmessung und der Volumenbestimmung der Vene konnte – unter der vereinfachten Annahme, dass es sich bei dem Venenvolumen um einen Zylinder handelt - auch die Innenoberfläche der Vene errechnet werden. Somit war es möglich, die Werte letztlich mit der Einheit $[X_a] \text{ min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ anzugeben.

Bestimmung der Faktor Xa Bildungsrate nach Inkubation der Venen unter arteriellen Flussbedingungen (pulsierender Druck und Fluss)

Diese Versuchreihe bestand nur aus zwei Versuchsgruppen, zum einen mit physiologischer NaCl-Lösung vorinkubierte und zum anderen mit Biseko vorinkubierte Venen. Die Vorbereitung der Präparate erfolgte analog zu den normalen Faktor Xa Messungen bis zum Ende der Vorinkubation mit den jeweiligen Präservationslösungen nach 90 Minuten.

Die Schweinevenen wurden dabei über die 3-Wege-Hähne mit einem geschlossenen Schlauch- bzw. Pumpsystem verbunden, welches über eine spezielle Vorrichtung pulsierende Wellen erzeugen konnte. Die Funktionsweise der in der Arbeitsgruppe Prof. Nees entwickelten Pumpe mit dem abgeänderten Versuchsaufbau und -ablauf wird im Ergebnisteil anhand Abbildung 12 und des weiterführenden Textes genau erläutert (s. Kap. 4.6. Ergebnisteil, S. 40).

3.7 Messung der Faktor Xa Bildungsrate im Lumen von venösen Bypass-Segmenten humaner Herkunft

Präparation der einzelnen Venen:

Nicht verwendete Bypass-Segmente wurden im Operationssaal unmittelbar nach ihrer Entfernung in mit humanem Transport-Medium befüllte 50 ml Falcon-Tubes überführt und darin ins Labor transportiert.

Dort wurden makroskopisch varizenfreie Abschnitte ausgewählt und zugeschnitten. In die beiden Venenenden wurde vorsichtig jeweils eine Gefäßkanüle eingeführt und mit chirurgischen Fäden angebunden. Daraufhin wurden die 3-Wege-Hähne an den Gefäßkanülen befestigt und die Dichtigkeit durch Befüllen mit Transportmedium über eine Spritze kontrolliert. Beim Spülen und Befüllen musste die physiologische Flussrichtung des Blutes beachtet und eingehalten werden. (Abb. 1g,h)

Versuchsablauf:

Die menschliche Vene wurde mit physiologischer NaCl-Lösung, die zu einer 0,01 mM Endkonzentration mit der Papaverin Lösung versetzt war, über die dem Schweineohren – Versuch analogen Apparatur mit einem Druck von 50 cm Wassersäule infundiert. Die 3-Wege-Hähne wurden verschlossen und die Venen 90 Minuten mit der Präservationslösung inkubiert. Vor dem Hintergrund, dass die Venen intraoperativ meist vollständig skelettiert wurden, war zu beachten, dass die Venenwand unter normal trockener Atmosphäre sehr schnell aus- oder antrocknete. Um dies zu verhindern, wurden die Venen während der Inkubation bei Zimmertemperatur mit Tüchern abgedeckt, die mit der jeweils verwendeten Inkubationslösung getränkt waren. Dies sollte eine mögliche Schädigung Venenwand insgesamt und somit auch die der Intima verhindern, um dadurch verursachte potentielle Verfälschungen unserer Messergebnisse auszuschließen.

Nach der Inkubation musste das Präparat gründlich mit KRT-Lösung gespült und quantitativ mit Reaktionslösung befüllt werden, sodass sich ausschließlich das KRT-Octaplex-Faktor VII_a Gemisch befand. Die Vene wurde nun in einer Zellkulturschale, angefüllt mit KRT-Lösung, im Zellkulturschrank bei 37 °C 45 Minuten inkubiert.

Die Probengewinnung und Auswertung der Messwerte erfolgte analog zu den einfachen Gewebefaktor Messungen in Schweinevenen. Nur bei Durchführung der Volumenbestimmung wurde aufgrund der im Vergleich zur Vena auricularis des Schweines viel größeren menschlichen Vena saphena magna, die sich darin befindliche Evans-Blue Lösung mit 10 ml Albumin anstatt mit 2 ml Albumin verdünnt und entsprechend ausgewertet.

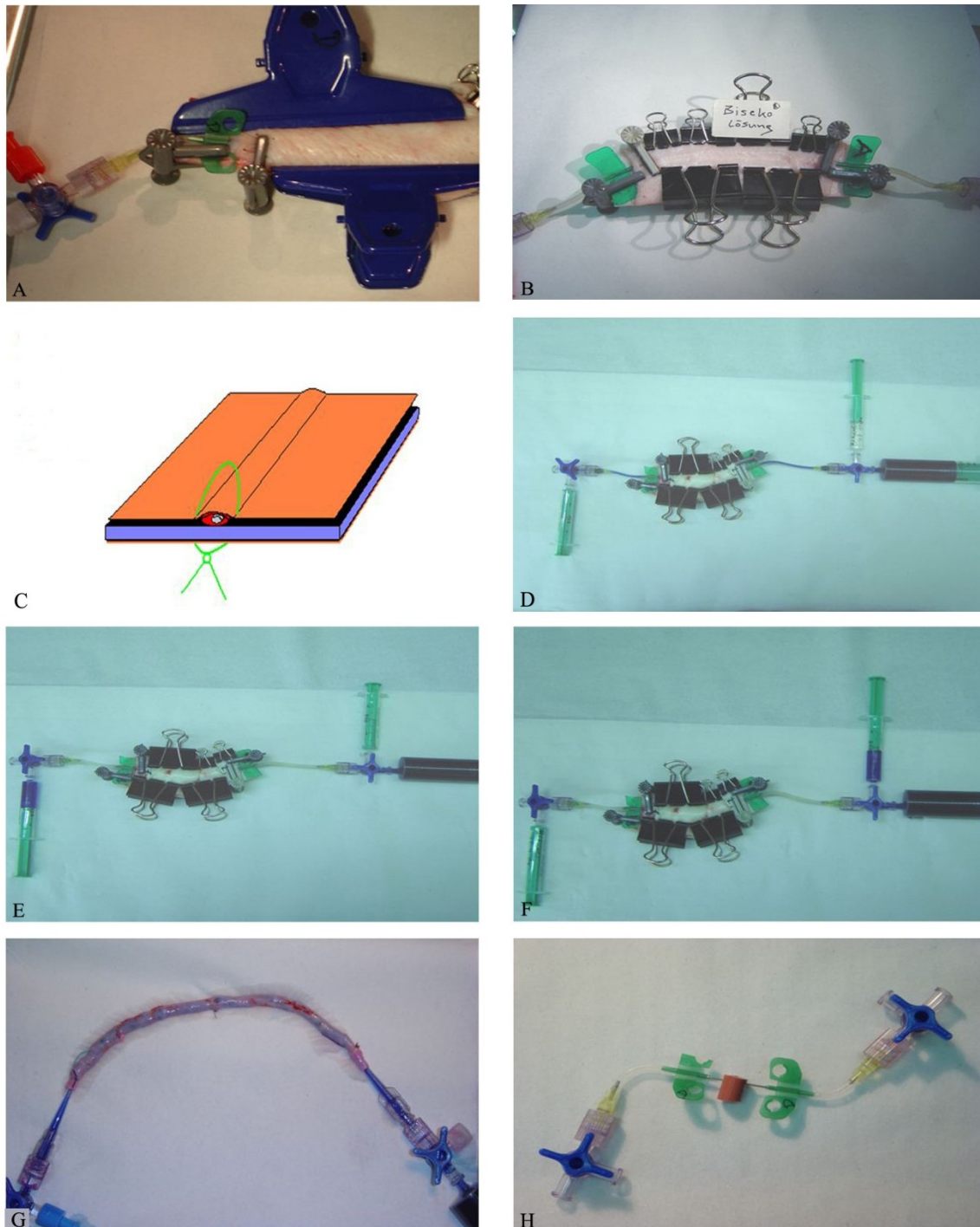


Abb. 1. Vorbereitung von Schweineohrvenen und humanen V. saphena Präparaten für hämostaseologische Untersuchungen. Abschnitte (A) und (B) zeigen zurechtgeschnittene Schweineohren, an denen das Gefäßvolumen der verbliebenen V. auricularis mittels Fogarty-Klemmen im Bereich der Gefäßenden mit eingebrachten Butterfly-Kanülen abgedichtet wurden. Kleinere nicht sichtbare Seitenäste wurden im Gefäßverlauf mit Paperclips „blind“ abgeklemmt. In Segment (C) ist ein solcher Gefäß-Kanülen-Übergang im Querschnitt schematisch dargestellt. Nach Einbringen einer Butterfly-Kanüle (grau) wird das Schweineohr durch gefäßnahes Durchstechen des Knorpel (blau) mit chirurgischem Nahtmaterial (grün) und anschließendem Ligieren desselben das Gefäßvolumen bereits grob abgedichtet; Die Bilder (D-F) zeigen das Prinzip der Volumenbestimmung. In (D) ist ein bereits mit Evans-Blau-Lösung befülltes Schweineohrpräparat dargestellt. Die Füllung ist über die rechts erkennbare Spritze erfolgt. Am selben 3-Wege-Hahn ist eine 2 ml-Spritze mit reiner 5%iger Albumin-Verdünnungs-Lösung sowie eine leere 2 ml-Spritze am anderen 3-Wege-Hahn angebracht. Segment (E) zeigt die Situation nach Befüllen des Präparates mit der „Albumin-Verdünnungslösung“ und parallelem Absaugen des Evans - Blue - / Verdünnungslösungs-Gemisches in die leere Spritze. Segment (F) zeigt die vertauschten

Spritzenpositionen im Vgl. zu Bild (E). Dies stellte die Ausgangsposition für die Wiederholung der zuletzt genannten Arbeitsschritte dar. Ein humanes V. saphena – Präparat mit eingebundenen Gefäßkanülen (Medtronic) an 3-Wege Hähnen ist dargestellt in Bild (G). Bild (H) zeigt die einfache Anordnung der Butterfly-Kanülen zu ihrer Volumenbestimmung. Die Kanülen wurden mittels eines simplen Gummipfropfens verbunden, der es ermöglichte das Volumen zwischen den Kanülen gleich Null zu setzen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung konfluenter Gewebefilme von humanen Endothelzellen venösen Ursprungs (V. saphena) in Reinkultur in Petrischalen sowie im „Transwell – Kultivations-System

Die isolierten Endothelzellpräparate wurden in Standardpetrischalen (Ø 35 mm, ca. 3×10^4 Zellen pro Schale) ausgesät und bis zur Konfluenz gezüchtet. Histologische Untersuchungen derartiger Kulturen ergaben einen hohen Reinheitsgrad von mindestens 95% (s. Abb. 2). Die gezüchteten Endothelzellen ließen sich über ihren hohen Gehalt an von Willebrand Antigen (vWF:Ag) identifizieren, das in zahlreichen granulären Organellen, sogenannten „Weibel-Palade-Körperchen“, deponiert war. Außerdem exprimierten die Kulturen Thrombomodulin (CD141) typischerweise im Bereich ihrer Interzellularspalten. Verunreinigende Fremdzellen (subendotheliale Perizyten und/oder glatte Muskelzellen) konnten über ihren Gehalt an glattmuskulärem α -Aktin erkannt werden.

4.2 Mikrokinematographische Beobachtung des Verhaltens gezüchteter Endothelzellen während der Inkubation in verschiedenen chirurgisch eingesetzten Präservationslösungen für Bypassgefäße

Abb. 3 zeigt eine Übersicht über das Gesamtsystem. Um die folgenden Zeitrafferstudien problemlos, insbesondere den Wechsel von Inkubationslösungen in den gefilmten Kulturen schnell durchführen zu können, wurde ein von mir konstruierter Schalendeckel in der Institutswerkstatt gefertigt. Die folgende Abb. 4 zeigt dessen technisches Prinzip. Wenn das Mikroskop zum Austausch einer Inkubationslösung gekippt wurde, konnte diese leicht mittels eines entsprechenden Schlauches im Deckel abgesaugt werden. Die Neuzugabe von Medium erfolgte über einen anderen Schlauch, an den schon vorher eine mit diesem Medium gefüllte Infusionsspritze angesetzt worden war.

Die Abb. 5 zeigt die Gewebearchitektur gezüchteten Endothelgewebes während der Inkubation mit Saline, Brettschneiderlösung, 5%iger Saline/ Albuminlösung oder dem kommerziell erhältlichen menschlichen Plasmaderivat (Biseko®), welches keine Isoagglutinine und Gerinnungsfaktoren ansonstwn aber alle Komponenten des menschlichen Blutplasmas enthielt. Während Saline zu einem raschen Verfall der endothelialen

Gewebestruktur führte, und auch die Inkubation mit HTK-Lösung eine schnell einsetzende, weite Öffnung der endothelialen Zellfugen bewirkte, blieb die Gewebearchitektur des Endothels bei Inkubation mit der Albumin-Lösung im Versuchszeitraum gut erhalten, wenn, wie in Abbildung 5 dargestellt, wenigstens geringfügige Ca^{2+} -Konzentrationen ($>0,1 \text{ mM}$) durch das verwendete Albuminpräparat in die Lösung eingebracht worden waren (die meisten kommerziell erhaltenen Albuminpräparate enthielten allerdings kaum Ca^{2+}). Während der Inkubation im Plasmaderivat blieb die Kontinuität der konfluenten Gewebekulturen langfristig vollständig erhalten, wobei sich sogar gelegentlich Mitosen beobachten ließen, wenn die Kulturen auf 37°C angewärmt wurden.

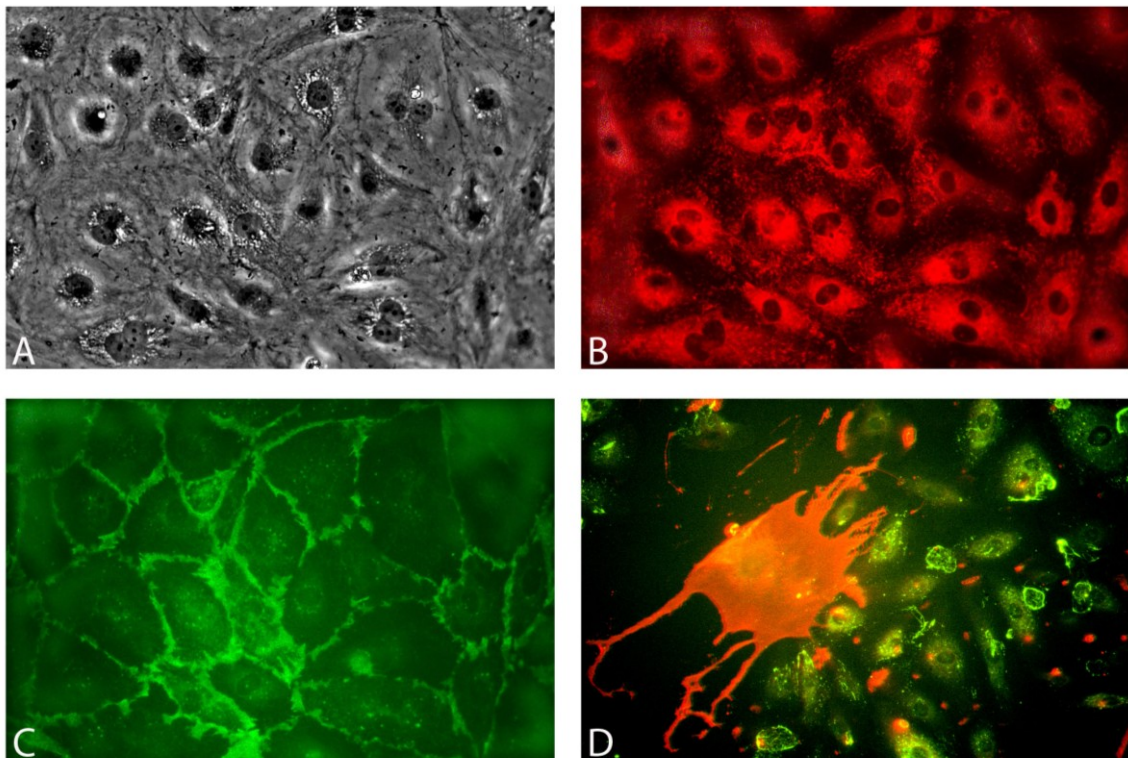


Abb. 2. Exemplarische konfluente Endothelzellkulturen in Phasenkontrastmikroskopie (A), nach immunhistochemischer Färbung gegen von Willebrandt Faktor Antigen (vWF:Ag) mit Anfärbung der Weibel-Palade-Körperchen (B) und immunhistochemischer Färbung von Thrombomodulin (CD141) im Bereich der endothelialen Zellgrenzen (C). Bild (D) zeigt die selektive immunhistochemische Färbung von Tissue-Faktor in einem subendothelialen Perizyten (rot), der von Endothelzellen umgeben ist (grüne Anfärbung des vWF:Ag).

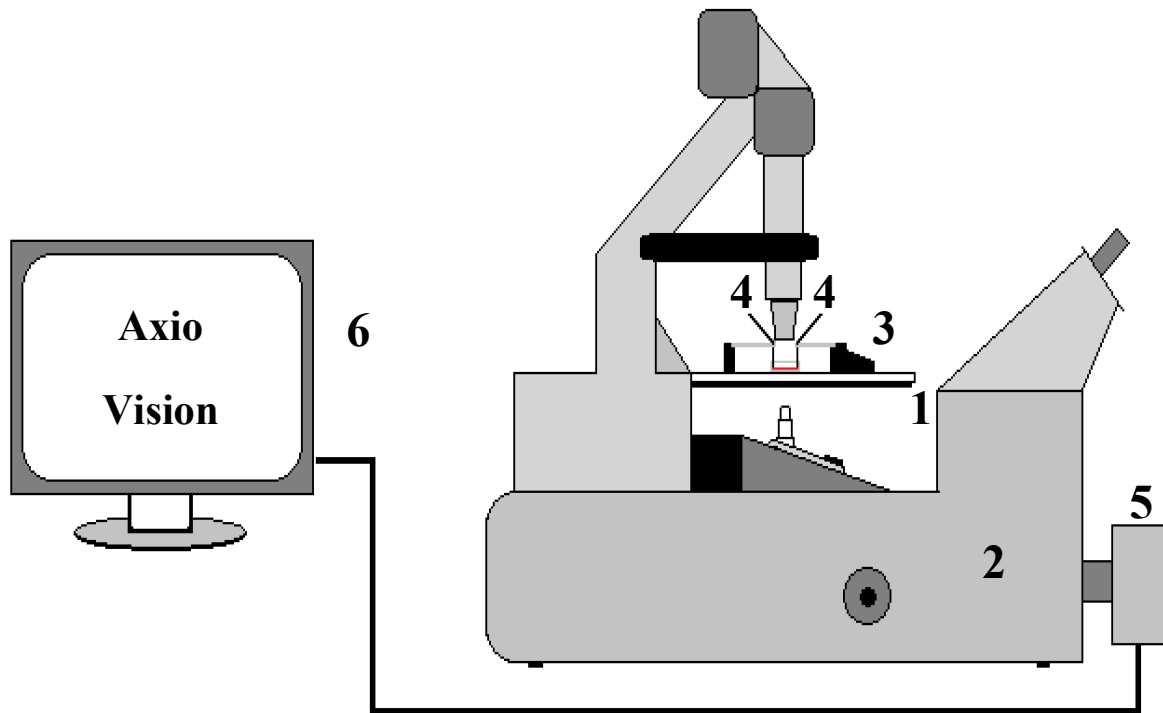


Abb. 3. Schematische Darstellung des Gesamtsystems für mikrokinematographische Untersuchungen an humanen endothelialen Zellkulturen. Durch eine am Objektisch (1) des Axiovert Mikroskops (2) angebrachte Inkubationskammer (3), die in der Arbeitsgruppe von Prof. Nees speziell zu diesem Zweck entwickelt wurde, konnte für Langzeitbeobachtungen an Endothelzellkulturen eine auf 37 °C temperierte, wasserdampfgesättigte 5%ige CO₂ Atmosphäre erzeugt werden. Die Kammer wurde mit konventionellen Zellkulturschalen bestückt, welche mit dem in Abb. 4 vorgestellten modifizierten Schalendeckel bedeckt waren, um Zellkulturmedienwechsel unter dem Mikroskop durchführen zu können, ohne die Kulturen aus der Inkubationskammer entfernen zu müssen. Der Wechsel erfolgte direkt über das ausgeleitete Schlauchsystem (4) des Schalendeckels. Mit der am Mikroskop angebrachten Digitalkamera AxioCam (5) wurden - gesteuert über die mikroskopeigene Software AxioVision - zu den gewählten Intervallen Aufnahmen der Zellkulturen gemacht und im angeschlossenen PC (6) jeweils als hochauflösende Einzelbilder und im AVI-Format abgespeichert

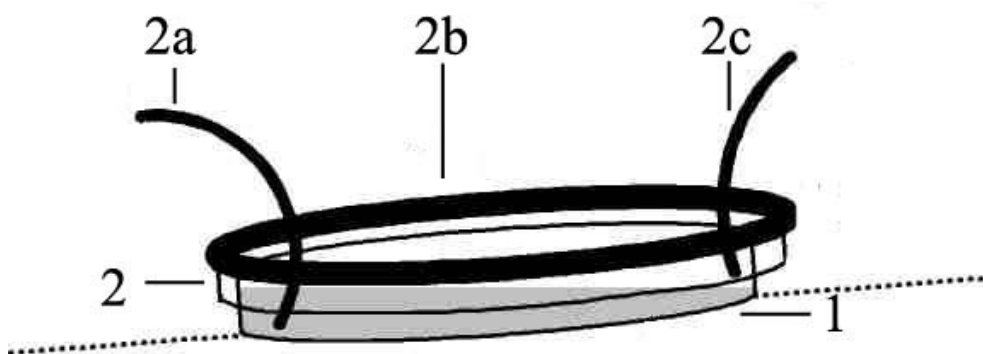


Abb. 4. Technische Einzelheiten eines speziell entwickelten Deckels für Petrischalen zum Zwecke des raschen Wechsels von Inkubationsmedien während mikrokinematographischer Untersuchungen. (1) Standfläche der mit Medium gefüllten Petrischale. (2) Schalendeckel mit Messingring (2b) beschwert, sowie ableitendem (2a) und zuführendem Schlauchsystem (2c) zum Absaugen bzw. Zufügen von Lösungen. Während des Wechsels der jeweiligen Inkubationslösung wurde das gesamte Mikroskop in Richtung des ableitenden Systems gekippt, um das vollständiges Absaugen des zuvor eingesetzten Mediums zu ermöglichen.

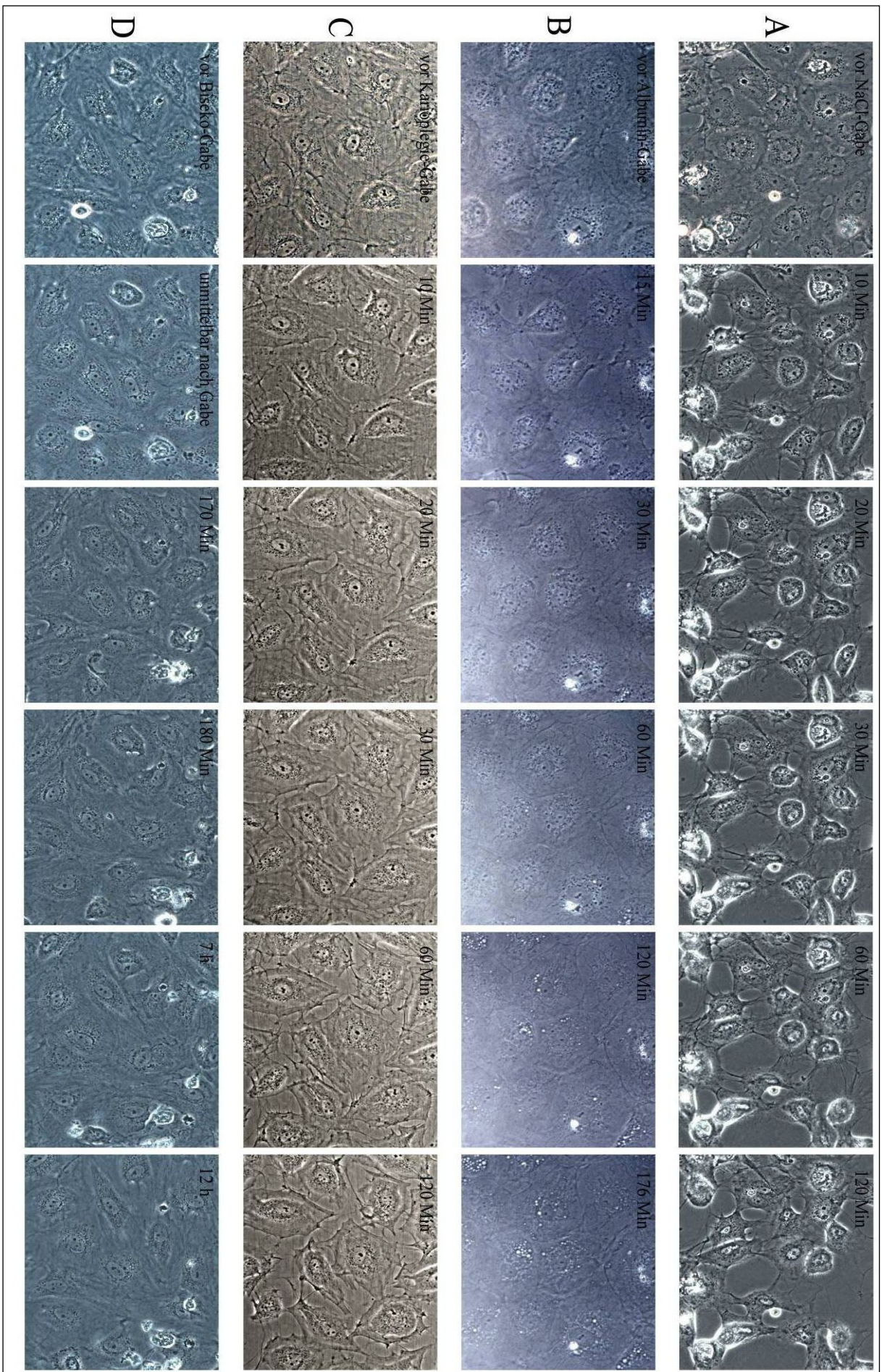


Abb. 5. Verhalten konfluenter Kulturen von Endothelzellen aus humaner V. saphena während Inkubation bei Zimmertemperatur (A) in „physiologischer Kochsalzlösung bzw. Saline“, (B) während Inkubation in „physiologischer Kochsalzlösung bzw. Saline“ nach Zusatz von 5% w/v humanem Serumalbumin (calciumhaltig), (C) während Inkubation in kardioplegischer Lösung“ (Bretschneider- bzw. HTK-Lösung) und (D) während Inkubation in Biseko® (humane Plasmaersatzlösung).

4.3 Filtrierbarkeit von Bypass-Präservationslösungen über konfluente venöse Endothelgewebe während der Inkubation in verschiedenen Präservationslösungen

Der im Verlauf der kinematographischen Zeitrafferstudien erhaltene Eindruck einer endothelschädigenden Wirkung aller untersuchten kristallinen Lösungen, welche zur routinemäßigen „Bypasspräservation“ verwendet werden, verfestigte sich in Messreihen, in denen der transendotheliale Fluss in zur Konfluenz gezüchtetem, venösem Endothelgewebe über längere Zeiträume gemessen wurde. Hierzu wurden konfluente Endothelschichten venösen Ursprungs (V. saphena) auf dem Boden von Transwell-Einsätzen, also auf mikroporösen Filtern gezüchtet. Mit Hilfe eines aus einfachen Komponenten aufgebauten Messsystems gelang es reproduzierbare Studien durchzuführen (s. Inset in Abb. 6).

Abb. 6 macht darüber hinaus deutlich, dass die untersuchten Endothelschichten in den zwei eingesetzten kristallinen Lösungen rasch ihre Dichtigkeit verloren. Dies gilt auch für die Saline-Albuminlösung, wenn sie – wie bei den hier dargestellten Konduktivitätsmessungen – einen Ca^{2+} -Gehalt von $<0,1 \text{ mM}$ besaßen. In Biseko© blieb die Kontinuität der Endothelschichten venösen Ursprungs dagegen vollständig erhalten, da sich stets nur ein konstanter, relativ kleiner Filtrationsfluss registrieren ließ.

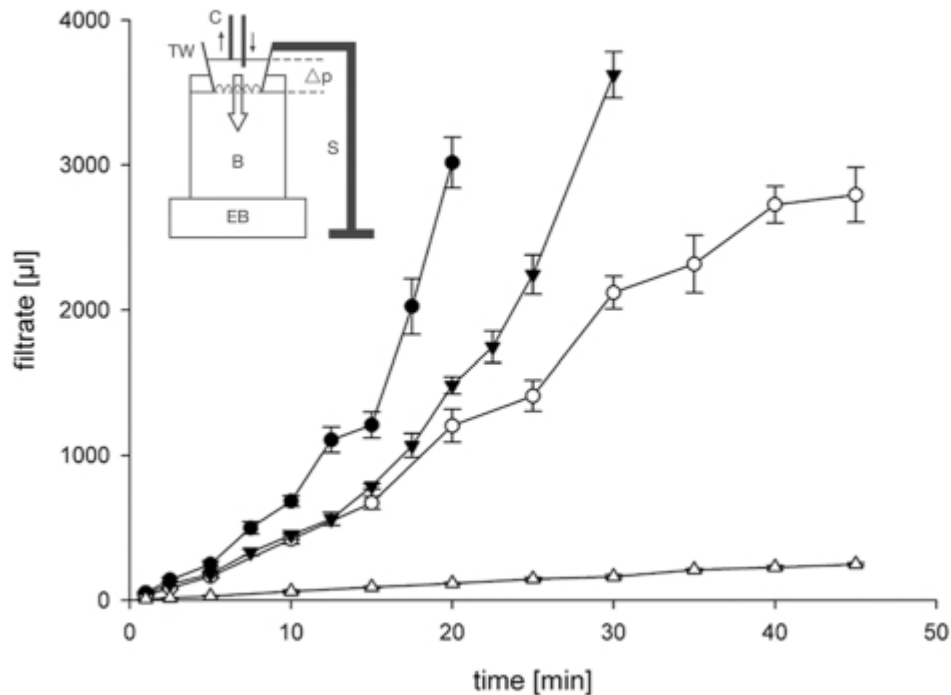


Abb. 6. Filtrierbarkeit von Bypass-Präservationslösungen über konfluente Endothelzellschichten nach Exposition verschiedener Präservationslösungen. Das Inset zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, mit dem Transwell-Filter (TW) gefüllt mit der jeweiligen Präservationslösung, der Befestigungsvorrichtung (S) für den Filter, den Kanülen (C), die über eine peristaltische Pumpe mit Reservoir den Druckgradienten Δp mit 1,5cm Wassersäule aufrechterhielten und dem Messbecher (B), befüllt mit der entsprechenden filtrierten Präservationslösung, die über eine elektronisch Waage (EB) überwacht wurde. Die graphische Darstellung zeigt die Entwicklung des transendothelialen Flusses [µl] über die Zeitachse [min] aufgetragen für physiologische NaCl-Lösung (leere Kreise), HTK- Lösung (ausgefüllte Dreiecke), Albumin-Lösung (ausgefüllte Kreise), und Biseko© (leere Dreiecke), jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung (n=8).

4.4 Exemplarische rasterelektronenmikroskopische Inspektion der Intimaoberfläche venöser Bypass-Segmente nach Lagerung in verschiedenen Präservationslösungen und anschließender Perfusion mit autologem Vollblut

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Intimaoberfläche intraoperativ in verschiedenen Präservationslösungen gelagerter Venensegmente (chirurgische Reststücke humaner V. saphena Gefäße bei koronaren Bypassoperationen) zeigten, dass sich kristalline Lösungen auch am Endothel anfänglich noch intakter Explantatvenen negativ auswirken. Dies wurde besonders deutlich, wenn nach dem „Präservationsintervall“ eine 10-minütige Perfusion der Venensegmente mit gruppengleichem Vollblut angeschlossen wurde. Wie die entsprechenden Bildreihen der folgenden Abb. 7 zeigen, kam es in der Folge zu komplexen

Interaktionen von zellulären und humoralen Blutkomponenten mit der verletzten Intimaoberfläche, die das Endothel verklebten und so im Verlauf der Perfusion zum zunehmenden Abschilfern der Endothelschicht führten. In den mit Plasmaderivat präservierten Venen ließ sich lediglich eine vermehrte Adhäsion neutrophiler Granulozyten nachweisen, die bei durchgehend nur kugelförmiger Morphologie aber offenbar nicht aktiviert waren. Die Endothelschicht derartiger Gefäße machte großflächig einen vollkommen intakten Eindruck, da sogar die Pseudovilli der Endotheloberfläche intakt blieben.

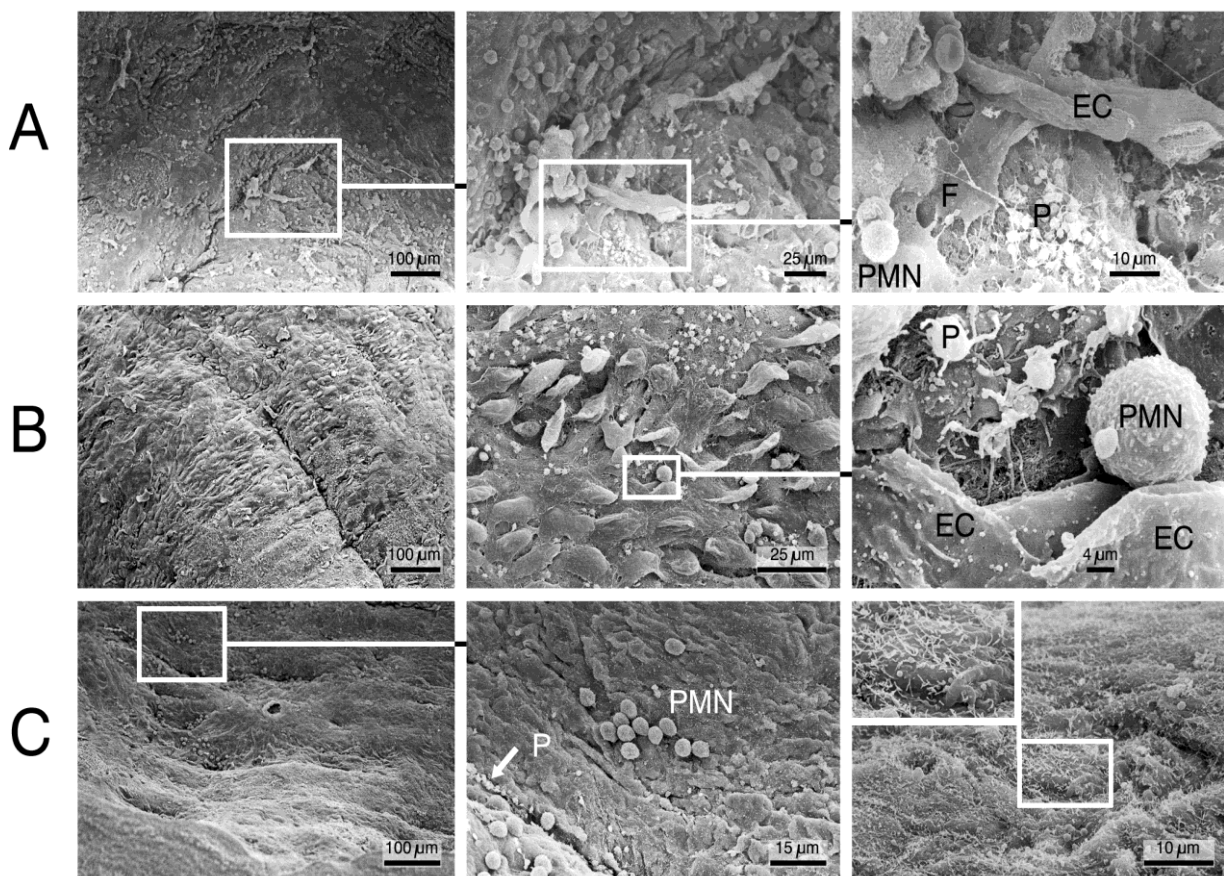


Abb. 7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der luminalen Oberfläche humaner V. saphena Grafts nach Inkubation mit verschiedenen Präservationslösungen über einen Zeitraum von 45 Minuten und nachfolgender langsamer Perfusion mit frischem blutgruppengleichem und heparinisiertem Vollblut (10 Minuten, in 37 °C). (A) Nach Lagerung in physiologischer NaCl-Lösung: Links: Überblick über eine sich verschlechternde intimale Oberfläche; mittleres und rechtes Bildelement zeigt in zunehmender Vergrößerung die entsprechenden Bildausschnitte mit Abbildung von Mikrothromben zusammengesetzt aus neutrophilen Granulozyten (PMN), Thrombozytenaggregaten (P), Endothelzellen (EC) und Fibrinfäden (F) im rechten Bildabschnitt. (B) Nach Lagerung in kardioplegischer Lösung: Überblick über typische endotheliale Oberfläche mit weiten Spalten zwischen den einzelnen Zellen nach Kontraktion derselben, hervorgerufen durch die Einwirkung von kardioplegischer Lösung. Der rechte Bildabschnitt zeigt in stärkerer Vergrößerung den Ausschnitt aus der mittleren Aufnahme mit zahlreichen bereits abgeflachten neutrophilen Granulozyten (PMN) und Blutplättchen (P), die sich im Bereich der geweiteten endothelialen Zellgrenzen anlagern. Die Thrombozyten bilden bereits zahlreiche Pseudopodien aus. (C) Nach Lagerung in Biseko®: Links zeigt hier einen Überblick über eine intakte endotheliale Intima; der mittlere Bildabschnitt zeigt Bildausschnitt links in stärkerer Vergrößerung mit einer Gruppe kugeliger, nur schwach adhärenter neutrophiler Granulozyten (PMN) und einen der seltenen Thrombozytenverbände (P) im Bereich eines Fibrinfadens (Pfeil). Es handelte sich dabei stets nur um sehr lockere Konglomerate. Der rechte Bildabschnitt zeigt reichlich gut erhaltene Mirkovilli endothelialer Plasmalemma. Eine stärkere Vergrößerung des Ausschnitts der Bildmitte findet sich im Inset oben links.

4.5 Pilotmäßiger Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades von unterschiedlich präservierten und anschließend mit Silber imprägnierten Bypassgefäßen

Zur Abgrenzung von Endothelläsionen und zur Quantifizierung intimaler Flächendefekte wurde ein - im Rahmen der vorliegenden Arbeit - standardisiertes Silberimprägnierungsverfahren zur spezifischen Anfärbung deendothelialisierter Intimabereiche eingesetzt. Nach digitaler Photographie wurden die Bilder mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop[®] kontrastiert und schließlich über eine Histogramm-Funktion der Software in quantitativen Bezug zu den endothelialisierten Intimabereichen gesetzt (s. Kap. 3.5., Seite 14 ff.).

Abb. 8 zeigt, dass sich charakteristische Unterschiede im luminalen Oberflächenbild bei Venensegmenten ergaben, die standardmäßig zuvor in verschiedenen Präservationslösungen inkubiert worden waren. Thromben, intramurale Schatten, Färbefartefakte und ungenügende Kontrastierungen wirkten sich sehr ungünstig auf die Klarheit der Bilder aus und machten graphische Überarbeitung vor der digitalen Planimetrie notwendig. Diese erfolgte unter visueller Kontrolle auf der Grundlage der in der Arbeitsgruppe erarbeiteten Erfahrung, wie sich Endothel und Subendothel bei gelungener Silberkontrastierung in charakteristischer Weise gegeneinander abgrenzen lassen. Verschiedene solcher Anlässe für eine Bildbearbeitung werden in Abb. 9 gezeigt. Die anschließende digitale Planimetrie basierte dann auf der Verwendung der Schwellenwertfunktion von Photoshop[®], wie im Methodenteil beschrieben. Der bestgeeignete Schwellenwert wurde jeweils empirisch ermittelt, indem bei der Auswertung eines bestimmten Bildes verschiedene Schwellenwerte vorgegeben wurden. Die Zielvorstellung war dabei, dass ein optimierter Schwellenwert vor allem gewährleisten sollte, dass die feinen Zellgrenzen einer idealen „Bisekovenne“ gerade nicht mehr der Farbe Schwarz zugeordnet wurden und eine komplett deendothelialisierte Intima dagegen 100%ig schwarz abgebildet wurde. Abb. 9 verdeutlicht dieses Vorgehen exemplarisch an typischen Abbildungen von in Biseko bzw. in Saline/Albumin (Ca^{2+} -Gehalt $<0,1\text{mM}$) präservierten Venenintimae und lässt im Übrigen anhand der dargestellten Tabelle die recht geringe Auswirkung der Schwellenwertwahl auf die Ergebnisse der Endothelquantifizierung deutlich werden, zumindest solange sich die Schwellenwerte in einem gewissen Rahmen um den Wert 100 bewegten.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse einer exemplarischen Endothelquantifizierung nach optimierter Fixierung und Silberimprägnierung typischer isolierter Venensegmente

dargestellt. Dabei wurde noch einmal die vorzügliche Endothelpräservierung in der „Biseko-Vene“ mit einem Endothelialisierungsgrad von etwa 90% deutlich. Der Endothelialisierungsgrad der anderen untersuchten Venen nahm in folgender Reihenfolge ab: Präservierung mit Saline/Albumin-Lösung (70%), mit kardioplegischer-Lösung (60%) und mit Saline (49%).

Tabelle 1: Ergebnisse einer ersten Anwendungsstudie für das neu entwickelte, computergestützte Planimetrieverfahren zur Ermittlung des prozentualen Endothelialisierungsgrades verschieden präservierter Venensegmente. (n = 4-6).

Versuchsgruppe	physiol. NaCl	Kardioplegie	Albumin	Biseko©
	27	55	80	87
	44	54	78	89
	49	67	70	85
	62	60	52	95
				95
				88
Mittelwert	46	59	70	90
Standardabweichung	13	5	11	4

Trotz der Schlüssigkeit der hier dargestellten quantitativen Ergebnisse ergibt sich für alle weiterführenden Planimetriestudien der Zukunft die wichtige Erkenntnis, dass schon bei der präparativen Vorbereitung zur Silberkontrastierung vorgesehener Gefäßsegmente viel mehr Augenmerk auf die Entfernung von Thromben und anderen Auflagerungen gerichtet werden sollte, als es im Rahmen der hier geschilderten Pilotstudie geschah. Auch muss die mechanische Behandlung aller Gefäßpräparate so vorsichtig wie möglich durchgeführt werden, damit gravierende Artefakte ausgeschlossen werden

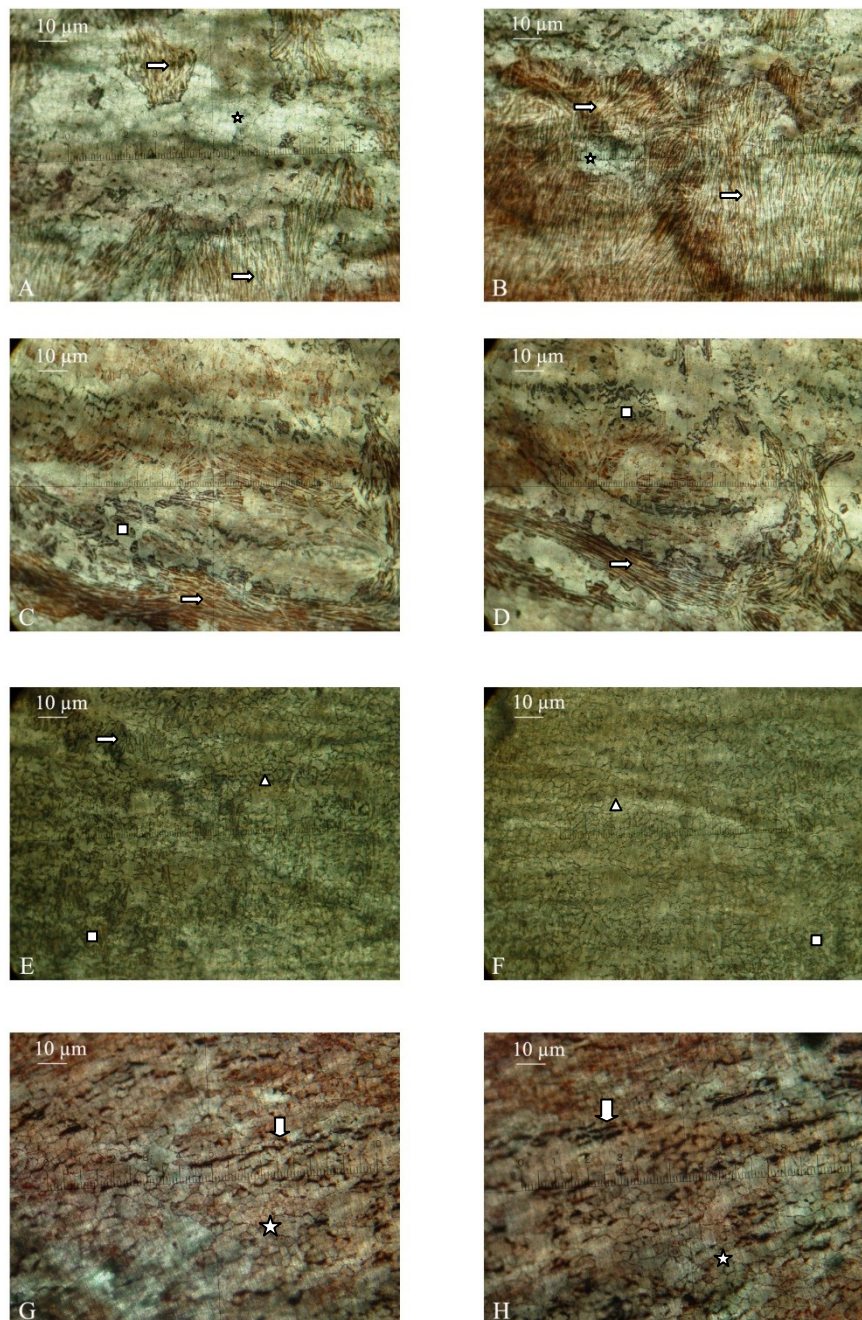


Abb. 8. Die Erkennung morphologischer Merkmale und Läsionen der Intima von *V. saphena* Segmenten nach Inkubation in ausgewählten Bypass-Präservationslösungen. (A), (B): In Saline inkubierte Venensegmente weisen großflächig deendothelialisierte Areale auf, in denen man charakteristisch langgestreckte, bräunlich gefärbten Zellen des subendothelialen Gewebes (waagrechte Pfeile) erkennt. Daneben sind noch erhaltene Endothelinseln, deren Zellfugen allenfalls feingezeichnet sind (Stern) zu finden; (C), (D): Mit kardioplegischer Lösung inkubierte Gefäße zeigen durchschnittlich etwas weniger ausgedehnte deendothelialisierte Areale (Pfeil) und Endothelinseln mit teilweise weit „geöffneten“ Zellgrenzen (Quadrat); (E) und (F): Venen nach Inkubation in Saline-/Albumin-Lösung sind gekennzeichnet durch weniger ausgedehnte deendothelialisierte Regionen (Pfeil), teilweise weit geöffnete Zellverbindungen (Quadrat), und deutlicher Färbung aller endothelialer Zellgrenzen (Dreieck); (G) und (H) zeigen Venensegmente nach Inkubation im Plasmaderivat Biseko mit weitestgehend erhaltenem Endothel und meist fein gezeichneten Zellgrenzen (Stern); nur vereinzelt zeigen sich weite Zellgrenzen. Diese Präparate zeigen aber auch exemplarisch, welche Beeinträchtigung der sachgerechten photographischen Dokumentation sich einstellen kann, wenn die histologischen Präparate während der Silberimprägnierung gedehnt oder gequetscht werden. Es können die hier erkennbaren schwarzen Bruchlinien in Längsrichtung der Präparate (senkrechte Pfeile) auftreten, die eine zuverlässige Planimetrie hinterher erschweren oder unmöglich machen.

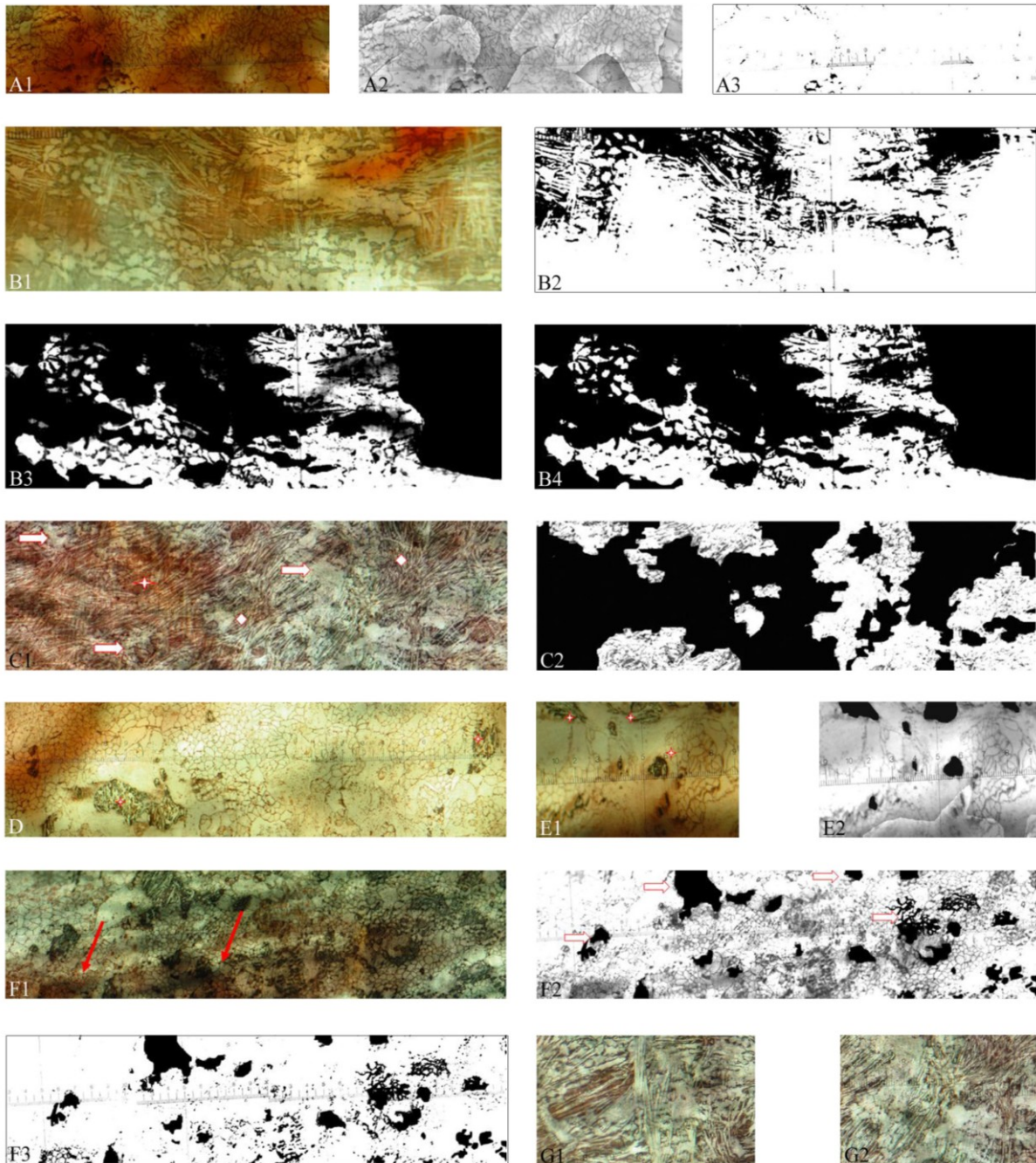


Abb. 9. Vorbereitende phototechnische Überarbeitung der Bilddokumente zur Ausschaltung von Störeffekten vor digitaler Planimetrie. (A1) „Bisekovene“ mit rötlich durchscheinenden Blukoagelaufagerungen an der äußeren Venenwand und intaktem Endothel; (A2) nach visuellem „Aufhellen“ derselben im Graustufenmodus (A3) und nach folglich richtiger Zuordnung des Artefaktes nach Anwendung der Schwellenwertfunktion; (B1) deendothelialisierte Areale teils mit nur geringem Kontrast zu intaktem Endothel; (B2) nach Anlegen des Schwellenwertes und falscher Zuordnung dieser Areale; (B3) digital unter visueller Kontrolle nachgetöntes deendothelialisiertes Areal; (B4) korrekte Auswertung nach erneutem Anlegen des Schwellenwertes; (C1) NaCl- inkubierte Vene mit Endothelinseln (Pfeile) inmitten großflächiger „denudierter“ Areale, charakterisiert durch bräunliche argentophile Färbung (Stern) und typische subendotheliale Gewebetextur (Raute); (C2) richtige Zuordnung nach visueller Überarbeitung; (D) Endothelläsionen (Stern) mit typischer subendothelialer Gewebetextur inmitten intakter Intimabereiche zweier Biseko-Venen; (E1-2) manuell nachgefärbte subendotheliale Inseln und aufgehellte Areale einer Biseko-Vene. (F1) Biseko-Vene mit großflächig intaktem Endothel übertönt durch Artefakte in tieferen Wandschichten (Pfeile); (F2) nach visueller Bildbearbeitung und Aufhellung der Wandfärbung bzw. Nachfärbung kleinerer deendothelialisierter Areale mit subendothelialer Gewebetextur (dicke Pfeile); (F3) nach Anlegen des Schwellenwertes; (G1-2) typische

Morphologie subendothelialer Zellen mit langgestreckten teils spindelartigen Zellkörpern im Gegensatz zum flächigen, pflastersteinartigen Erscheinungsbild von intakten und kaum angefärbten (hellen) Endothelbereichen

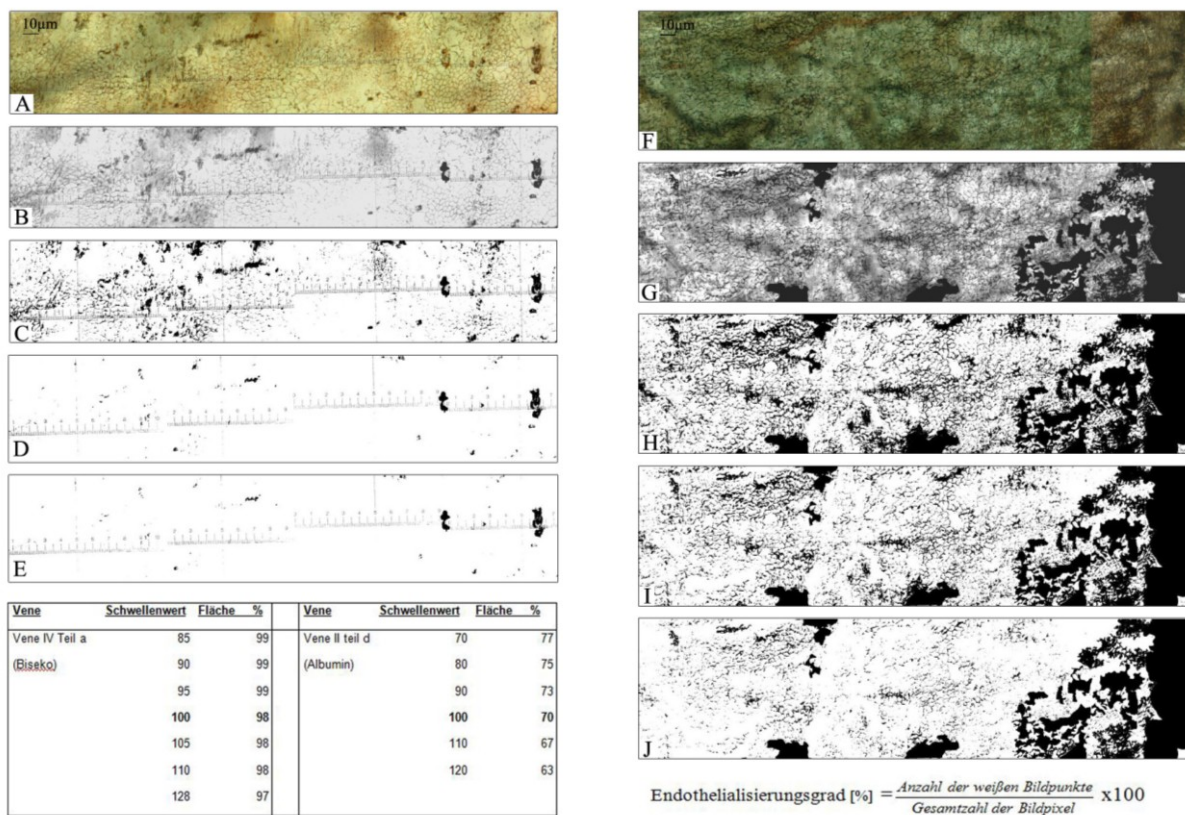


Abb. 10. Quantifizierung des Flächenanteiles deendothelialisierter Bezirke auf der Innenoberfläche von Bypassvenen: Bilddokumente zur Verdeutlichung des Einflusses des eingestellten Schwellenwertes bei dem erprobten digitalen Planimetrieverfahren. (A) In Biseko präserviertes längeres Venensegment mit annähernd idealen Charakteristika dieser Versuchsgruppe (großflächig erhaltenes Endothel, sehr feine Zeichnung der Zellgrenzen), ohne Notwendigkeit zur vorbereitenden Bildbearbeitung; (B) Bild im Graustufenmodus, vor beispielhaftem Anlegen eines bestimmten Schwellenwertes; (C) Schwellenwert 160 als Beispiel eines sehr hohen Schwellenwertes; (D) Schwellenwert von 100, empirisch als optimaler Schwellenwert für unsere Vorgaben ermittelt; (E) Schwellenwert von 90, als Beispiel eines niedrigeren Schwellenwertes. (F-J) Oben beschriebenes Vorgehen wiederholt am Beispiel einer „Albuminvene“ mit optimal ausgeprägten Charakteristika dieser Versuchsgruppe (überwiegend erhaltenes Endothel mit weiten oder stark gefärbten Zellgrenzen); Im Einzelnen: (F) Fotomontage vor Bearbeitung; (G) Bilddarstellung im Graustufenmodus nach digitaler Überarbeitung unter visueller Kontrolle und Anlegen verschiedener Schwellenwerte von 120 (H), 100 (I) und 70 (J). Die in die Abbildung Bild inkorporierte Tabelle fasst die exemplarisch ausgewerteten Flächenintegrale beider Untersuchungsgruppen zusammen, rechts am unteren Bildrand ist die Formel wiedergegeben, nach welcher der prozentuale Endothelialisierungsgrad errechnet wurde.

4.6 Messung der Aktivierung von Gerinnungsfaktor X in der V. auricularis des Schweineohres und in humanen V. saphena Segmenten

Abb. 11 stellt das Prinzip des zugrundeliegenden gerinnungsphysiologischen Tests zur Messung der Aktivierung von Faktor X dar, die wir als indirektes Maß für die Konzentration von Gewebefaktor ansahen. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der Faktor X-Aktivitätsbestimmung in Schweineohrvenen zusammen. Die in Biseko präservierten Venen zeigten die geringste Potenz zur Aktivierung von Faktor X im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bei der die Faktor X-Aktivität in frisch explantierten Venen ohne Vorinkubation mit einer der Präservationslösungen gemessen wurde (s. Kapitel 3.6. „Bestimmung der Blankwerte und der Referenz-, bzw. Nullwerte“, S. 19 ff.). Fast doppelt so hohe Faktor X_a - Bildungsraten lieferten dagegen die in Abuminlösung (unter Abwesenheit von Calciumionen!) präservierten Venenpräparate, und noch höhere Werte ergaben die Gruppe der in physiologischer NaCl-Lösung präservierten Venen. Die Versuchsreihe mit Inkubation mit kardioplegischer Lösung konnte aufgrund einer überraschend stark ausgeprägten Ödembildung im perivaskulären Gewebe des Schweineohres durchweg nicht ausgewertet werden, da ein Austritt des Octaplex-Versuchsreagenz und auch der Evans-Blue-Lösung zur Volumenbestimmung aus dem Gefäßlumen sehr wahrscheinlich war.

Bei den Nullwerten sowie der Biseko Gruppe fielen außerdem eine erfreulich geringe Standardabweichung (1,9 bzw. 1,4) auf: Dies steht im Gegensatz zu den viel höheren Standardabweichungen der Messergebnisse von Venen, die mit Saline/Albumin bzw. mit Saline präserviert worden waren (5,0 bzw. 6,9).

Tabelle 3 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der Faktor X-Aktivierung der mit Saline inkubierten humanen V. saphena Reststücke. Es findet sich eine deutlich höhere Faktor X_a-Bildungsrate als in den entsprechenden NaCl-inkubierten Schweineohrvenen (vgl. Tabelle 2), die sich auch statistisch absichern ließ.

Bestimmung der Faktor Xa Bildungsrate in Schweinevenen nach standardmäßiger Lagerung in verschiedenen Präservationslösungen und Erholungsphase unter arteriellen Druck- und Perfusionsbedingungen in einem komplexen Zellkulturmedium bei 37 °C

Diesen Bedingungen wurden Venen unterworfen, die entweder in Saline oder in Biseko[®] präserviert worden waren. Ihre Präparation erfolgte standardmäßig. Danach wurden sie über 3-Wege-Hähne mit einem geschlossenen Schlauch- bzw. Pumpsystem verbunden, welches über eine speziell konstruierte Pumpe (Entwurf Prof. Dr. S. Nees) pulsierende Druckwellen zwischen 25 und 120mmHg erzeugen konnte. Die Funktionsweise wird in Abb. 12 erläutert.

Versuchsablauf:

Die in den Pumpkreislauf gebrachten Venensegmente wurden 60 Minuten bei einer Pulsfrequenz von 80/min mit der im System befindlichen, reich zusammengesetzten Nährlösung (Gewebekulturmedium DMEM-10 mit Zusatz von 10% v/v Kälberserum bei 37 °C vorgewärmt) perfundiert. Zielvorstellung war der Gedanke, dass sich das möglicherweise beim Transport und bei der Lagerung der Gefäßsegmente kontrahierte Endothelgewebe unter diesen Bedingungen erholen und seine Zellfugen wieder dicht schließen konnte. Die Probengewinnung und Volumenbestimmung erfolgte standardmäßig analog zur bereits erläuterten Versuchsreihe ohne „Nachinkubation“.

Tabelle 3 stellt die entsprechenden Ergebnisse dar. Es ergibt sich im Vergleich mit den Aktivitätswerten der Saline bzw. Biseko-Gruppen in Tabelle 2, wie erwartet, eine verringerte Faktor X Aktivität bei allen Venen, die sich vor dem Test erholen konnten. Die Werte der in Biseko präservierten Segmente lagen dabei zum einen wieder viel niedriger als die der Saline-Gruppe, und zum anderen waren sie fast identisch mit den Werten der Kontrollgruppe frisch präparierter und sofort untersuchter Venen, aus der vorher beschriebenen „regulären“ Versuchsreihe ohne Erholungsphase (s. Tabelle 2).

Abbildung 13 fasst alle Ergebnisse nach statistischer Auswertung in Boxplots zusammen. Dabei werden durch die Graphiken jeweils der Median, die 10, 25, 75 und 90er Perzentilen, sowie die beiden Extremwerte der jeweiligen Gruppe dargestellt (falls $n > 9$ ist). Bei Betrachtung der P-Werte des students t-Test waren alle Werte, bis auf die der Gruppe „Biseko mit DMEM-Nachinkubation unter arteriellen Bedingungen“ (P-Wert = 0,14) signifikant bis hochsignifikant zu den Werten der 0-Wert Gruppe.

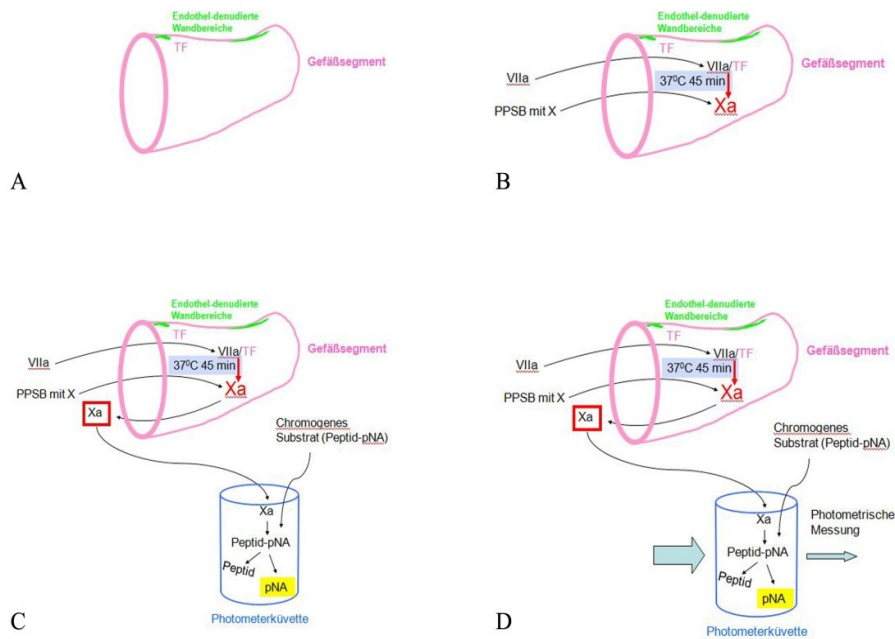


Abbildung 11. Prinzip der photometrischen Erfassung von Faktor X-Aktivität. (A) Durch den in deendothelialisierten Gefäßabschnitten freiliegenden „Tissue Factor“ (TF) wurde (B) nach Zugabe des Probenmischungs mit aktiviertem Faktor VII (VIIa) und Octaplex-Lösung (eingestelltes Gemisch der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X) die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert. Während Inkubation dieses Gemisches über 45 Minuten bei 37 °C im Gefäß-Segment wurde aktivierter Faktor X (Xa) in proportionaler Menge zur deendothelialisierten Fläche gebildet. (C) Eine bestimmte Menge des Probenmischungs aus dem Gefäß wurde in eine Photometerküvette überführt und mit Xa spezifischem chromogenen Substrat „S-2222“ versetzt. (D) Über die Bildung eines gelb gefärbten Spaltproduktes konnte die Xa-Konzentration via photometrische Messungen bestimmt werden.

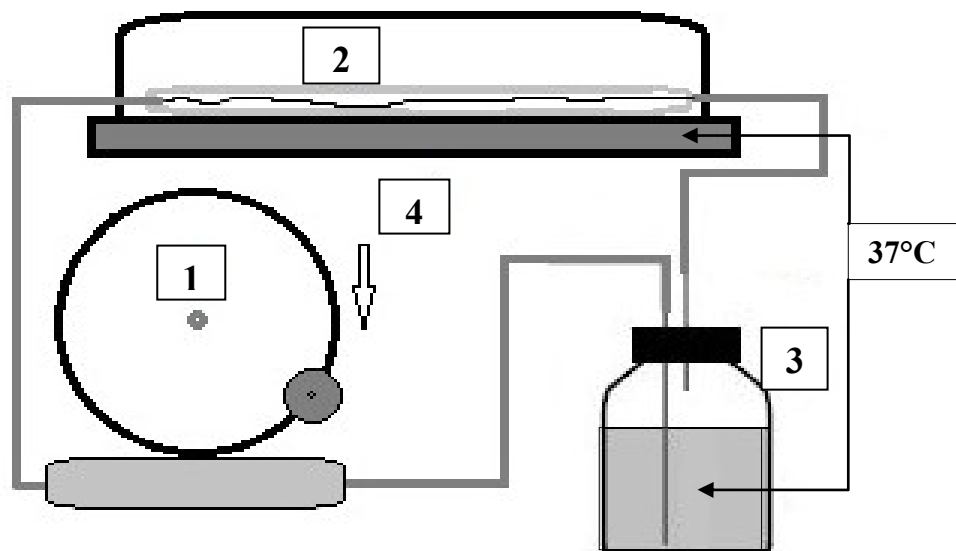


Abbildung 12. Schematischer Versuchsaufbau für die Erholungsphase von Venenpräparaten in Kulturmedium unter arteriellen Flussverhältnissen und 37 °C. Durch die variabel einstellbare Drehgeschwindigkeit des Motors einer speziell entwickelten peristaltischen Pumpe (1) konnte eine gewünschte Pulsfrequenz in dem jeweiligen Venensegment (2) angelegt und ein arterielles Druckprofil erzeugt werden. Das im System befindliche Medium wurde re-zirkuliert. Der Vorratsbehälter (3) selbst befand sich in einem Wärmebad, um das Medium auf die gewünschten 37 °C zu temperieren, zusätzlich wurde auch das Venensegment während des Versuches auf einer Wärmeplatte (4) bei 37 °C gelagert.

Tabelle 2. Einzelergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen mit Mittelwert und Standardabweichung

	<u>0-Werte</u>	<u>NaCl</u>	<u>Albumin</u>	<u>Biseko</u>
<u>Bildung von Faktor Xa:</u> [fmol/min*cm ²]	3,2 3,4 6,1 6,3 3,0 5,9 1,8 3,7 8,0 3,1	20,8 18,0 17,2 9,3 23,3 13,7 22,6 15,6 12,2 12,2 12,8 8,8 31,0 9,0 12,4 31,8 13,2	9,0 9,7 9,8 8,3 9,7 10,3 24,2 21,1 15,3 14,2 13,0	7,9 8,3 5,7 7,0 7,9 8,5 7,2 6,3 4,3 9,7 5,7 7,3
<u>n-Werte</u>	10	17	11	12
<u>Mittelwert</u>	4,5	16,7	13,1	7,2
<u>Standardabweichung</u>	1,9	6,9	5,0	1,4

Tabelle 3. Ergebnisse der Faktor Xa-Bestimmung in humanen V. saphena Präparaten nach Inkubation mit Saline.

	<u>NaCl-Menschenvenen</u>
<u>Bildung von Faktor Xa</u> [fmol/min*cm ²]	48,4 41,2 50,3 54,7 74,0 75,6 57,2
<u>n-Werte</u>	7
<u>Mittelwert</u>	57,4
<u>Standardabweichung</u>	12,9

Tabelle 4. Ergebnisse der Faktor Xa-Bestimmung in der V. auricularis des Schweineohres nach standardmäßiger Inkubation mit Biseko bzw. Saline und anschließender Erholung in Gewebekulturmedium DMEM-10 unter arteriellen Flussverhältnissen.

	<u>NaCl</u>	<u>Biseko</u>
<u>Bildung von Faktor Xa</u> [fmol/min*cm ²]	14,5 12,1 13,6 13,5 17,4	5,2 7,1 5,0 3,9 4,8 4,2 7,2 5,6 6,0 6,5
<u>n-Werte</u>	5	10
<u>Mittelwert</u>	14,2	5,6
<u>Standardabweichung</u>	1,8	1,1

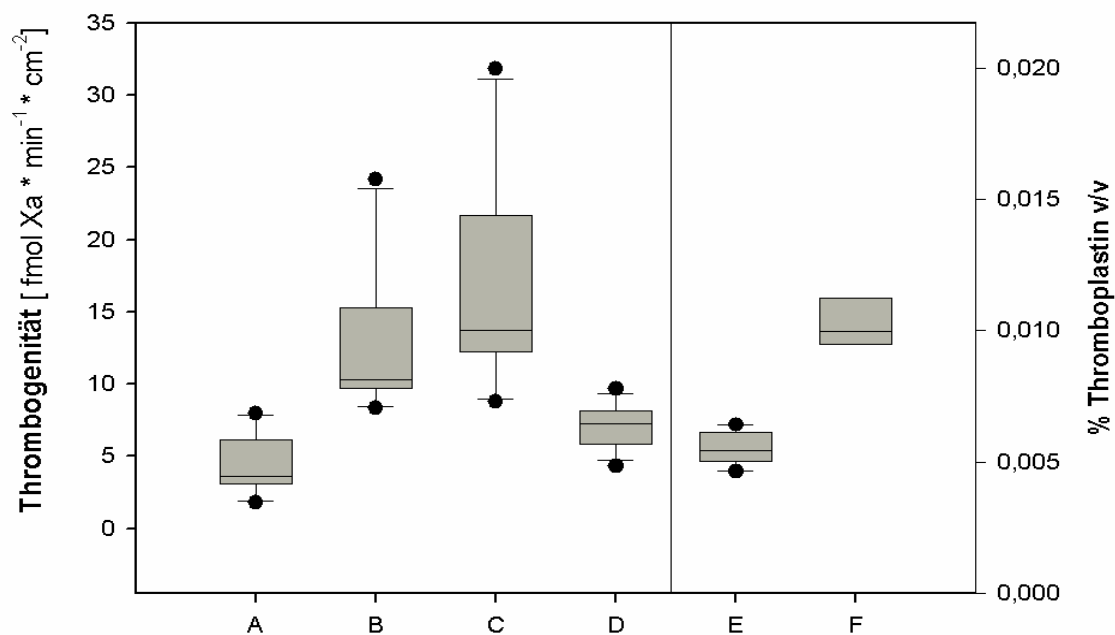


Abbildung 13. Thrombogenität der Innenwand verschieden vorbehandelter Ohrvenenpräparate (ausgedrückt durch die Bildungsrate von Gerinnungsfaktor Xa/min/cm² Intimaoberfläche) (A) frisch isolierte und sofort untersuchte Venenpräparate (n=10); (B) Präservierung in 5,0%iger Humanalbuminlösung in Saline (n=11); (C) Präservierung in Saline (n=17); (D) Präservierung in Biseko (n=12); (E) Messung nach Präservierung in Biseko und nach anschließender Erholung in DMEM-Kulturmedium bei 37 °C unter arteriellen Flussverhältnissen (n=12); (F) Messung nach Präservierung in Saline und nach Erholung in DMEM-Kulturmedium bei 37 °C unter arteriellen Flussverhältnissen (n=5);

5 Diskussion

5.1 Beobachtungen an humanen Endothelzellen

Grundlage für alle Betrachtungen im Rahmen dieses Kapitels waren histologische Untersuchungen an kultivierten humanen Endothelzellen und restlichen Bypass-Segmenten venösen Ursprungs. Außerdem wurde die Barrierefunktion in vitro etablierter Endothelschichten untersucht, wobei die transendothelialen Filtrierbarkeit routinemäßig in der Bypasschirurgie eingesetzter Präservationslösungen sowie eines Plasmaderivates (Biseko) gemessen wurde.

Die Inkubation von menschlichen Endothelzellkulturen in physiologischer Kochsalzlösung – weltweit die meistverwendete Präservationslösung für Bypass-Grafts – führt wie in Kapitel 4.2. gezeigt werden konnte - zu einer ausgeprägten und raschen Schädigung der Endothelzellen. Dies verwundert zunächst, da Endothelzellen charakteristischerweise zu rascher Stoffwechselanpassung bei Nährstoffentzug befähigt sind [17]. Die ATP-Konzentrationen in den Zellen werden genau kontrolliert und reguliert, sodass beispielsweise unter hypoxischen Bedingungen [65] oder während Inkubation in glukosefreier Balanced-Salt-Lösung - bei pH 7,4 und 37° Celsius - energieverbrauchende Prozesse rasch heruntergefahren werden können und sich die intrazellulären ATP-Konzentrationen nur geringfügig ändern [18]. Vor diesem Hintergrund lassen sich die morphologischen Beobachtungen der rasch einsetzende Kontraktion der Zellkörper, des Ablösens der Zellen vom Schalenboden, sowie das schnelle Absterben der untersuchten Zellkulturen nach Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung und die damit verbundene zunehmende Durchlässigkeit der Kulturen (s. Kap. 4.3.) nicht allein auf das Fehlen von „Energieträgern“ in der Präservationslösung zurückführen.

Wahrscheinlicher als Ursache ist eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase hervorgerufen durch das Fehlen von K^+ Ionen. Die lebenswichtige Bedeutung dieser membranständigen Ionenpumpe für die Aufrechterhaltung des zellulären Membranpotentials, die Osmoregulation sowie die äußere Gestalt der Zellen ist hinlänglich bekannt und beschrieben [15]. Da Saline als Präservationslösung ohne hochmolekulare Bestandteile darüber hinaus keinen onkotischen Druck erzeugen kann, entsteht bei parallel dazu gestörter oder sogar zum Erliegen gekommener Osmoregulation der Zellen, ein äußerst lebensbedrohliches Milieu für die Endothelzellen. Das völlige Fehlen von Calcium-Ionen in physiologischer Kochsalzlösung

liefert vermutlich einen weiteren Beitrag zur Schädigung der Endothelzellen bis hin zum Absterben.

Durch das Fehlen essentieller Plasmaproteine wie Albumin und auch Glykoproteine kommt es des weiteren höchstwahrscheinlich zur signifikanten Abnahme der endothelialen Glykocalyx unter Umständen bis zum Zusammenbruch letzterer, welche unter physiologischen Bedingungen mit ihrer Vielzahl von gebundenen Plasmaproteinen die intimale Oberfläche des Endothels mit einer Dicke von ca. 0,5 µm bildet. Neben der wichtigen Aufgabe zellulärer Blutbestandteile von den darunterliegenden intimalen Strukturen [54], als eine Art molekularer Filter [26,32,47,55] abzuschirmen, reduziert sie auch deutlich auftretende Scherkräfte, hervorgerufen durch das vorbeiströmende Blut [59].

Die Widerstandsfähigkeit vaskulärer Endothelzellen in Bezug auf metabolische Belastungen und ihre Fähigkeit längere Zeiträume ohne Energiezufuhr zu überleben, wird offenbar auch während einer intraoperativen Lagerung der Gefäße in hyperkaliämischer, sog. kardioplegischer Lösung nach Bretschneider, über einen Zeitraum von 45 Minuten bei Raumtemperatur nachweislich beeinträchtigt. Charakteristisch für diese Lösung, die zur Kardioprotektion entwickelt wurde, ist eine sehr hohe Kalium-Konzentration (10 mM). Die Aufnahme von K⁺ Ionen über den Na⁺2Cl⁻K⁺-Co-Transporter, die für Gliazellen beschrieben wurde [3], führt dabei indirekt über die nachfolgende Entfernung der Na⁺ Ionen aus der Zelle, um den transmembranen Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, zu einem andauernden Energie-Verbrauch, da dieser Vorgang über die bereits erwähnte Na⁺/K⁺-ATPase katalysiert wird. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Zellen unter diesen Bedingungen ihren Stoffwechsel, zumindest ohne starke Abkühlung, herunterfahren können.

Explizit im Zusammenhang mit Endothelzellen wurden diese Sachverhalte zwar noch nicht systematisch erforscht, die Ergebnisse unserer Untersuchungen an Endothelzellkulturen nach Inkubation mit kardiopleger Lösung können aber sicherlich zumindest als Hinweis für eine prinzipielle Übertragbarkeit auf Endothelzellen gewertet werden. So wurde ja deutlich ein Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion beobachtet, der sowohl morphologisch in den mikrokineatographischen Untersuchungen, durch ein abruptes „Öffnen“ der interzellulären Verbindungen (s. Abb. 5, Kap. 4.2. Ergebnisteil, S. 29), als auch funktionell durch die Veränderung der hydrodynamischen Konduktivität (s. Abb. 6, Kap. 4.3. Ergebnisteil, S. 31) eindeutig nachvollziehbar war.

Albumin bildet mit ca. 60% bekanntlich den größten Anteil der Plasmaproteine bei der Erzeugung des onkotischen Druckes in humanem Serum. Dennoch wurde eine endotheliale

Schädigung durch die kristalloiden Lösungen, wie oben genannt, in vitro auch bei der Verwendung von 5%iger Albumin-Lösung beobachtet, wenn auch nicht in so ausgeprägtem Maße, falls eine ausreichende Ca-Menge zugegeben wurde, wie in Kapitel 4.3. und 4.4. erläutert. Andernfalls kam es ebenfalls – wie in den mikrokinematographischen Untersuchungen zu beobachten – zur massiven Ablösung der Zellen innerhalb kürzester Zeit nach Beginn der Inkubation.

Nach Anwendung eines im klinischen Alltag der Intensivmedizin verwendeten Plasmaersatzmittels Biseko[®] hingegen zeigte sich eine annähernd unveränderte endotheliale Integrität. Dieses Plasmaersatzmittel, frei von Isoagglutininen und Gerinnungsfaktoren, beinhaltet aber nicht nur physiologische Konzentrationen von diversen Kohlehydrat-Substraten, K⁺ Ionen und ausreichende Mengen an Ca²⁺ Ionen, sondern ist auch physiologisch gepuffert und enthält alle weiteren Plasmaproteine inklusive Wachstumsfaktoren. Dadurch konnte wahrscheinlich die zelluläre Aktivität bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der endothelialen Zytoarchitektur gedrosselt werden, da während der Inkubation ein annähernd physiologischer onkotischer Druck aufgebaut und aufrechterhalten werden konnte, was sich in den in den Ergebnissen der morphologischen sowie funktionellen Zellkulturversuche widerspiegelt, die eine über Stunden hinweg unveränderte endotheliale Integrität während Inkubation mit Biseko[®] zeigten.

5.2 Exemplarische Inspektion der Intimaoberfläche von venösen Bypass-Segmenten nach Silberimprägnierung mit pilotmäßigem Einsatz digitaler Bildauswertetechnik zur Quantifizierung des Endothelialisierungsgrades und anschließender Bahnung weiterführender Planimetrie-Verfahren mit zweckmäßigerer Technik

Die Untersuchung der V. saphena Bypassgrafts, welche in Kochsalzlösung gelagert und im weiteren intraoperativen Verlauf kurz mit serumalbuminhaltiger-Kochsalzlösung gespült wurden, zeigten entsprechend den Beobachtungen an den Zellkulturen eine ausgedehnte, in vielen Fällen fast vollständige endotheliale Denudierung der Gefäßwand.

Dabei muss erneut betont werden, dass das Risiko einer mechanischen Verletzung des Endothels, durch das für die Untersuchung entwickelte OP-Protokoll zur Venengewinnung und durch die regelhafte Überwachung desselben, bestmöglich minimiert wurde. Ebenso

wurde natürlich bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate größtmögliche Vorsicht zur Vermeidung von Verletzung der inneren Gefäßwände angewandt.

Ein größeres Restrisiko mechanischer Schädigungen, vor allem während Präparation im Labor, konnte durch die Fixierung gegen einen intraluminalen Druck minimiert werden. Diese Druckfixierung wurde initiiert, nachdem es in Vorversuchen zu einer massiven Kontraktion der Gefäßwände – teilweise bis zum „Verlust“ des Lumens - kam, wenn die V. saphena Gefäßsegmente ohne Gegendruck einfach in Fixationslösung überführt wurden.

Die mikroskopische Inspektion der silberimprägnierten V. saphena Präparate bestätigte in den meisten Fällen die Beobachtungen der Zellkulturversuche, und zeigte wie in Kap. 4.4. erläutert die beste Endothelkonservierung nach Inkubation mit Biseko. Eine abnehmende Endotheldeckung fand sich danach in den in Albumin inkubierten, den in kardioplegischer Lösung inkubierten und in den in Saline inkubierten Venen.

Die aufwändige und untersucherabhängige Bildbearbeitung, notwendig durch das nicht zu unterschätzende Artefakt-Potential, macht den Einsatz der Silberimprägnation als Färbung für Reihenuntersuchungen im Rahmen größerer klinischer Studien und vor allem für routinemäßige Bypass-Graft Qualitätskontrollen im klinischen Alltag eher unbrauchbar, da die Bearbeitung neben des hohen zeitlichen Aufwandes, auch Erfahrung in der Bewertung der verschiedenen histologischen Phänomene erfordert. Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung eines neuartigen Färbeverfahrens, mit dem unter Einsatz von Alcianblau Endothel-denudierte Intimabereiche hochspezifisch angefärbt, und dann unter Einsatz eines in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe von Prof. Nees mit dem Lehrstuhl für Medizintechnik der TU München in Garching optimierten Software-Programmes planimetriert werden können. Unser Verfahren soll demnächst im Rahmen geplanter klinischer Studien zur Verbesserung der intraoperativen Bypass-Präservierung serienmäßig eingesetzt werden [72].

5.3 Hämostaseologische Untersuchungen an verschieden präservierten Venensegmenten

Die Auswirkung der verschiedenen Präservationslösungen auf die endotheliale Integrität konnte zunächst in lebenden Endothelzellkulturen humanen, venösen Ursprungs morphologisch sowie funktionell analysiert werden. Diese Untersuchungen stellten für uns quasi erste Vorversuche an lebendem Endothelgewebe dar und halfen, die im Folgenden diskutierten gerinnungsphysiologischen Studien an vitalen Bypass-Segmenten zu planen.

Grundlegend wurde für uns die Entwicklung einer Methode, welche die Messung der Gerinnungsaktivierung in Schweineohrvenen nach Inkubation in verschiedenen Präservationslösungen ermöglichte. Eine mechanische Vorschädigung der Intima der Venen im Schweineohrmodell war nach der Standardisierung der besonders vorsichtig gestalteten Schweineohrdissektion und der Perfusion der darin enthaltenen Blutgefäße mit einem optimiertem Transportmedium (s. Kap. 2.3. „Lösungen“ S. 8) weitgehend auszuschließen. Letzteres konnte dagegen im Hinblick auf humane Bypass-Grafts, trotz entsprechend ausgearbeiteter Präparationsprotokolle, nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die theoretischen Grundlagen der Versuchsreihe bildeten die nachfolgend erläuterten gerinnungsphysiologischen Gesichtspunkte. Gewebe-Faktor findet sich subendothelial in hohen Konzentrationen besonders in Perizyten [33] und wird unter physiologischen Bedingungen durch die Endothelschicht vom Blutstrom abgeschirmt. In deendothelialisierten Gebieten der Gefäße ist der Gerinnungsfaktor somit „freigelegt“ [53]. In der Untersuchungsreihe wurde mittels eines spezifischen chromogenen Substrates (S-2222) die Faktor X-Aktivierung als Endprodukt der extrinsischen Gerinnungskaskade photometrisch bestimmt. Durch das verwendete Versuchsgemisch mit den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und dem Zusatz von aktiviertem Faktor VII (Faktor VII_a) - in geringer Konzentration notwendig, um die Gerinnungskaskade in Gang zu setzen – wurde spezifisch nur der extrinsische Weg zur Aktivierung von Faktor X herangezogen. Die gemessene Faktor X-Aktivierung wurde so ausschließlich durch den Gewebe-Faktor in der Intima nach Komplexbildung mit dem zugesetzten Faktor VII_a katalysiert. Die gemessene Faktor X-Aktivität kann somit als Maß für die endotheliale Integrität gewertet werden, speziell vor dem Hintergrund pathologischer Gerinnungsaktivierung in deendothelialisierten Arealen venöser Bypass-Grafts.

Die Ergebnisse zeigten wie erwartet eine ausgeprägte Faktor-X Aktivierung nach Inkubation mit Saline, und die Inkubation mit 5%iger Saline-/Albumin-Lösung führte zu einer mäßig

reduzierten Aktivierung. Die geringste Faktor X-Aktivität mit einer annähernd niedrigen Gerinnungsaktivierung wie die der Kontrollgruppe, welche sofort nach Präparation ausschließlich mit dem Versuchsreagens inkubiert wurde, beobachtet man nach Inkubation mit Biseko[®], wobei beide zuletztgenannte Gruppen eine gewisse Grundaktivität der Gerinnung zeigten.

Bei Betrachtung der Messergebnisse fällt in der „Biseko-Gruppe“ sowie in der Kontrollgruppe eine ähnlich geringe Standardabweichung der Einzelergebnisse im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen auf. Dies deutet zum einen darauf hin, dass das Endothel in diesen Präparaten großflächig erhalten war und der subendothelial lokalisierte Gewebefaktor deshalb weitgehend vom Gefäßlumen (bzw. der hämosteologischen Testlösung) abgeschirmt war. Zum anderen zeigen die wesentlich größeren Standardabweichungen nach Inkubation mit Albuminlösung oder Saline, dass es im Hinblick auf Endothelschädigung durch diese Präservationslösungen große interindividuelle Unterschiede gibt.

Untersuchungen mit kardioplegischer Lösung nach Bretschneider konnten nicht ausgewertet werden. Aufgrund sehr ausgeprägter paravasaler Ödembildung in den Schweineohren, bereits nach kurzer Vorinkubation der Gefäße mit Bretschneider Lösung, war es nicht möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu hervorbringen. Der starke Flüssigkeitsaustritt aus den Blutgefäßen ins Gewebe war während des Versuchs einer Volumenbestimmung mittels der in Kap. 3.4. beschriebenen Methode unter Verwendung von Evans-Blue-Lösung eindrucklich zu beobachten, da im gesamten Ödemgebiet eine zumindest flaue Blaufärbung zu beobachten war. Eine sichere und exakte Volumenbestimmung der untersuchten Venen war dadurch nicht zu gewährleisten.

Dieser makroskopische Befund lässt für sich allein auf eine deutliche Schädigung der endothelialen Integrität schließen. Albuminmoleküle sind mit ca. 66 kDa etwas größer wie Prothrombinogen also Faktor VII mit ca. 59 kDa. Wenn man sich vor Augen führt, dass der Farbstoff Evans Blue in der zur Volumenbestimmung verwendeten Albumin-Lösung ausschließlich an Albuminmoleküle gebunden vorkommt und die Blaufärbung des extravasalen Subkutangewebes im Schweineohr auf einen Austritt des Farbstoffes durch die Gefäßwand hindeutet, ist zumindest theoretisch von einer Endothelschädigung auszugehen, die mindestens so stark ausgeprägt ist, dass subendotheliale Bereiche auch Faktor VII zugänglich sind und somit auch mit der Initiierung intravasaler Gerinnungsprozesse zu rechnen ist. Zusammenfassend spiegelten sich die Ergebnisse der Zellkulturversuche sowie der histologischen Untersuchung der V. saphena Bypass-Graft-Reststücke in den in dieser Versuchsreihe gemessenen Faktor-Xa Aktivitäten eindeutig wieder.

Die Ergebnisse an Venen, die nach Lagerung in Saline oder Biseko zunächst eine Erholungsphase in reichem Zellkulturmedium unter arteriellen Perfusionsbedingungen durchlaufen hatten, zeigten aufgrund analoger Überlegungen, dass sich ein weitgehend intaktes Endothel - wie nach Lagerung in Biseko - fast seine vollständig Dichtigkeit aufbaut. Dagegen konnte sich eine derartige Regeneration des Endothels in Venen, die in Saline präserviert worden waren, nicht nachweisen lassen.

Was nach Perfusion verschieden präservierter humaner V. saphena Segmente mit gruppengleichem Vollblut geschehen kann, wird im Folgenden diskutiert.

5.4 Weitreichende pathophysiologische Konsequenzen der Deendothelialisierung venöser Bypass-Grafts

Die gezeigten akuten morphologischen Folgen der großflächigen Endotheldenudation mit gleichzeitiger Freilegung des Subendothelraumes in entnommenen Vena saphena Bypassgrafts, hervorgerufen durch die unterschiedlichen Präservationslösungen und deren hämostaseologische Konsequenzen, müssen vor allem vor dem Hintergrund beleuchtet werden, dass die Grafts im geschädigten Zustand als aortokoronarer Bypass nicht nur arteriellen Druckverhältnissen ausgesetzt sind, sondern durch die Perfusion mit Vollblut auch vielen zellulären und azellulären Blutbestandteilen ausgesetzt sind, die entsprechend der intimalen Schädigung mit der Graftoberfläche interagieren.

Als bedeutendste zelluläre Bestandteile des Blutes sind in diesem Zusammenhang sicherlich Thrombozyten und neutrophile Granulozyten zu nennen, wenn man deren hämostaseologische Funktion betrachtet. Da das Gefäßendothel in seiner Gesamtheit den physiologischen „Blutbehälter“ unseres Körpers bildet, scheint es im Falle von Endothelschädigungen zweckmäßig, dass Thrombozyten und neutrophile Granulozyten, welche sich aus Vorläuferzellen mit hämostaseologischen und unspezifisch immunologischen Funktionen entwickeln [50], durch Entzündungsfaktoren rasch aktiviert werden [14] und dann eng miteinander [20,73] sowie mit dem Endothel zusammenarbeiten [61], um Blutungen und Infektionen schnellstmöglich zu beheben bzw. verhindern. Speziell hierzu haben Thrombozyten bekanntlich eine ausgesprochen hohe Affinität zu subendothelialen Strukturen [13] und können neutrophile Granulozyten über die Bildung von Fibrinnetzen „einfangen“, sobald sie aktiviert sind [37].

Die Reaktivität der Thrombozyten wird darüber hinaus auch durch Erythrozyten beachtlich erhöht [42]. Dies ist - vor dem Hintergrund der einleitend erwähnten klinischen Problematik beim Einsatz venöser Bypass-Grafts - für explantierte, intraoperativ gelagerte und letztlich implantierte Bypass-Grafts von außerordentlicher Bedeutung, da jene ja zwangsläufig von den Schnittflächen ausgehende Entzündungsmediatoren aufweisen.

Darüber hinaus ist unter solchen Bedingungen auch mit einer Aktivierung der intimalen Perizyten zu rechnen, wenn man publizierte Beobachtungen bedenkt, welche hohe Gewebefaktor - Konzentrationen im Bereich der venösen Intima bereits unter Normalbedingungen zeigen konnten, die während intraoperativer Lagerung der Grafts noch stark zunahm [53]. In Bypass-Grafts, die, wie in der Arbeit beschrieben, in den klassischen Präservationslösungen (physiologische NaCl-Lösung oder kardioplegische Lösung nach Bretschneider) gelagert wurden, muss es daher beim ersten Blutkontakt nach Re-perfusion zu einer massiven Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, sowie wahrscheinlich auch zu einer Aktivierung der intimalen Perizyten kommen.

Schon die unkontrollierte Anlagerung der Granulozyten alleine könnte durch die Freisetzung aggressiver Sauerstoff Metaboliten [35] und oder hydrolytischer Enzyme möglicherweise bereits die endotheliale Glykokalix und folglich das Gefäßendothel selbst örtlich schädigen [63]. Die massive Anlagerung und Aktivierung der Thrombozyten an die endotheliale Oberfläche hat jedoch noch deutlich weitreichendere pathologische Konsequenzen in der Art, dass die freigelegten subendotheliale Perizyten in die Reaktion mit einbezogen werden, was in elektronenmikroskopischen Untersuchungen in der AG von Prof. Dr. Nees gezeigt werden konnte [71], und zumindest bei mikrovaskulären Perizyten eine kontinuierliche Tissue-Faktor und Prothrombinase Bildung an deren Zelloberfläche bekannt ist [10,51].

Auch unter dem Einsatz von Heparin, dessen gerinnungshemmende Fähigkeit durch die Bindung von Antithrombin-III und die stark beschleunigte Inaktivierung der proteolytischen Enzyme der Blutgerinnung charakterisiert ist [31], ereignen sich aber weiterhin unbeeinflusst die Interaktionen zwischen Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und dem subendothelialen Gewebe [71]. Selbst zusätzlich zugefügte Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure oder Dipyridamol können diese Wechselwirkungen nicht unterdrücken [74].

Daher ist es nicht überraschend, dass die in der AG Prof. Nees beobachtete Anlagerung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten an freigelegtes Subendothel und auch an

scheinbar intaktes Endothel auf fixierten Gefäßsegmenten, welche in heparinisiertem autologen Blut präserviert waren, auch von anderer Stelle berichtet wurde [58].

In dem Moment, in dem ein so geschädigter Bypassgraft mit adhärenenten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, während Reperfusion mit frischem voll gerinnbarem Blut in Kontakt kommt, werden als Folge des freiliegenden Gewebefaktors unverzüglich die Vielzahl der plasmatischer Gerinnungsfaktoren aktiviert, womit die Initialphase der Blutgerinnung begonnen hat [5,12,27,29,39].

Das lokal gebildete Thrombin führt als stärkster bekannter Thrombozytenaktivator innerhalb von Millisekunden [9] zur Aktivierung aller anliegenden Thrombozyten in der Umgebung. Letztere sind ja nicht nur für die Abdeckung und übergangsmäßige Abdichtung von Gefäßverletzungen verantwortlich, sondern bilden und konzentrieren auch koagulatorische Vorgänge an ihrer Oberfläche.

Diese thrombozytengebundenen Prozesse führen zur Freisetzung bioaktiver Peptide und Proteine, welche wiederum die Rekrutierung weiterer Thrombozyten, Bestandteile der unspezifischen Immunantwort inklusive neutrophiler Granulozyten [25], die Expression spezifischer für Gerinnungsfaktoren hochaffiner Membranrezeptoren [34,69] sowie die Freisetzung von Proenzymen wie Faktor V [64] initiieren.

Zur einer weiteren massiven Verstärkung der initialen Thrombinbildung kommt es darüber hinaus durch die vorhandene sehr große katalytische Oberfläche im Bereich der Thrombozyten für die nachfolgende Bildung von Fibringerinseln, wenn man bedenkt, dass die Gesamtoberfläche aller Thrombozyten im Bereich einer Wunde Quadratmeter betragen kann [5,27,29].

Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nees wiederholt dokumentierte Bildung von losen fibrinreichen Thrombi auf der Oberfläche von V. saphena Bypassgrafts [71], die in autologem heparinisierten Blut gelagert wurden, kann durch die Tatsache begründet werden, dass rezeptorgebundene Gerinnungsfaktoren nicht durch heparinabhängige Inhibitoren wie Antithrombin III gehemmt werden können [49].

Die anschließende Phase der Koagulation [12] ist besonders durch die rasche und massenhafte Bildung von Thrombin charakterisiert, verstärkt durch hohe Faktor Xa Konzentrationen, welche wiederum durch die angelagerten Faktor VIIIa – Faktor IXa –Komplexe sowie die auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten befindlichen Prothrombinase-Komplexe, mit den Faktoren Va, Xa, und Prothrombin, gebildet werden [5,27,29,34,69].

Der physiologische Stellenwert dieser Bindung von Faktor Va und IXa an aktivierte Thrombozyten im Bezug auf die Aktivierung von Faktor X lässt sich am besten durch die beispielhafte Beleuchtung der kinetischen Parameter dieses Vorgangs darstellen [57].

Durch die Bildung dieses Komplexes kommt es nämlich zu einer 13-millionenfachen Steigerung der katalytischen Aktivität verglichen mit der Aktivität ungebundener Gerinnungsfaktoren.

In Anbetracht dieser Ausführungen ist es offensichtlich, warum unangemessen gelagerte venöse Grafts während der Re-Perfusion mit gerinnbarem Vollblut durch die unmittelbar einsetzenden Gerinnungsprozesse im Bereich der geschädigten Endothelregionen sehr rasch mit einem festen Fibrinnetzwerk bedeckt sind. Unter arteriellen Druckverhältnissen werden diese Gerinnsel im vorbeifließendem Blutstrom leicht „weggespült“, wobei sie große Areale des vorgeschädigten Endothels mitreißen können, wie es anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bereits nach vorsichtiger und langsamer Perfusion mit Vollblut gezeigt werden konnte (s. Kap. 4.4., Abb. 7, S. 32).

Angesichts dieser Erkenntnisse, stellt sich jedoch auch die Frage, warum oder vielmehr wie die Vielzahl der Patienten, denen solche insuffizient gelagerten Bypass-Grafts implantiert werden, dennoch überleben können bzw. warum es nicht unausweichlich zu erneuten akuten Gefäßverschlüssen kommt, wo doch vom Auftreten dieser Vorgänge in den Grafts ausgegangen werden muss.

Man muss hierbei ja bedenken, dass diesen gerinnungsaktivierenden Prozessen im Bereich des venösen Grafts effektive gerinnungshemmende Eigenschaften, des distal folgenden - mehr oder weniger intakten - mikrovaskulären Gefäßbettes entgegenwirken.

Diese unter physiologischen Bedingungen ausschließlich an der Endotheloberfläche lokalisierten Eigenschaften beinhalten anti-aggregatorische, gerinnungshemmende und fibrinolytische Funktionen des Endothels [66,67].

Aufgrund der Tatsache, dass diese Oberfläche im stromabwärtsliegenden Kapillarnetz darüber hinaus enorm an Größe zunimmt – 1 ml Blut kommt dort mit ca. 5000 cm² Endotheloberfläche in Berührung [4,6] – kann auch eine große Anzahl weggespülter im koronaren Kapillarnetz gefangener Mikrothromben innerhalb weniger Stunden bis Tage vollständig lysiert werden.

Zu bedenken ist dabei aber, dass besonders bei Gefäßpatienten, die sich einer Bypassoperation meist aufgrund koronarsklerotischer Veränderungen unterziehen müssen, auch das stromabwärts liegende kapillare Gefäßnetz geschädigt sein kann und somit in Gang

gesetzte Gerinnungsvorgänge möglicherweise nicht mehr suffizient kompensiert werden können. Vor diesem Hintergrund lässt sich sicherlich das Auftreten der in der Einleitung erwähnten akuten Bypass-Verschlüsse [11,23,60] erklären.

Auch im weiteren klinischen Verlauf, selbst wenn ein akuter thromboembolischer Gefäßverschluss nicht eintritt, bilden die in den Grafts freigelegten subendothelialen Zellen eine latente Gefahr für die Patienten. Zum einen durch das dauerhaft erhöhte Risiko unkontrollierter Thrombosierung ausgehend von der geschädigten Gefäßwand mit dem subendothelial freiliegenden Gewebefaktor. Zum anderen kann es längerfristig zu einer Wandverdickung durch die ungehemmte Proliferation der subendothelialen Zellen kommen, welche normalerweise durch die intakte Endotheloberfläche unterbunden wird. Diese zunehmende Wandverdickung kann schließlich zu einer nicht mehr tolerablen Lumeneinengung der implantierten venösen Bypassgrafts mit den entsprechenden Durchblutungsstörungen oder thrombotischen Prozessen führen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener gefäß- bzw. kardiochirurgisch routinemäßig zur intraoperativen Lagerung und Dichtigkeitsprüfung eingesetzter, sogenannter „Präservationslösungen“ auf die Endothelauskleidung venöser Bypass-Segmente untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten dabei besonders vor dem Hintergrund der einleitend beschriebenen „saphenous vein grafts disease“ sowie der kürzeren Lebensdauer venöser Bypässe im Vergleich zur Lebensdauer arterieller Bypässe.

Im Rahmen der Arbeit konnten zunächst in vitro die teils verheerenden Auswirkungen vor allem kristalliner Lösungen auf humane Endothelzellkulturen sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht aufgezeigt werden. Neben mikrokineatographischen Untersuchungen der morphologischen Veränderungen venöser Endothelzellkulturen erfolgten funktionelle Untersuchungen speziell im Hinblick auf die Barrierefunktion der Endothelzellen, die bekanntlich die innerste Zellschicht der Gefäßwand aufbauen. Dies wurde mittels hydraulischer Konduktivitätsmessungen an selbst isolierten und auf Transwell-Filterssystemen zur Konfluenz gezüchteten Endothelzellkulturen durchgeführt. Während nach Inkubation mit rein kristallinen Lösungen, wie Saline oder kardioplegischer Lösung, aber auch mit einer 5%igen Albuminlösung in Saline relativ rasch ein Zusammenbruch der endotheliellen Integrität zu beobachten war, konnten die physiologischen Eigenschaften der Endothelzellkulturen morphologisch wie funktionell nur durch die Verwendung der komplexen Plasmaersatzlösung Biseko[®] über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden.

Um diese in vitro gemachten Beobachtungen in vivo an humanen V. saphena Präparaten verifizieren zu können, wurde eine größere Serie intraoperativ gewonnener, in den verschiedenen Lösungen präservierter V. saphena Reststücke histologisch mittels Silberimprägnierung der Intima aufgearbeitet und mit digitaler Fotodokumentation auf den Erhalt der physiologischen Zellarchitektur ihrer Intima untersucht. Dabei wurde zum ersten Mal das Prinzip eines einfachen, computergestützten Planimetrieverfahrens zur Quantifizierung von Endothelläsionen erprobt. Es stellte sich allerdings dabei heraus, dass das eingesetzte histologische Verfahren der Silberimprägnierung der Endothelschicht nicht im vollen Umfang zweckmäßig war. Dies lag vor allem am relativ hohen Artefakt-Potential, u.a. hervorgerufen durch die notwendige Fixation der Gefäßsegmente und an der nicht immer eindeutigen Anfärbung endothelialer bzw. subendothelialer Strukturen der intimalen Gefäßwand. Dies machte einerseits aufwendige präparative Vorarbeiten für die Färbung aber

auch aufwendige Bildbearbeitungen vor der computergestützten Planimetrie notwendig, welche beide ein relativ hohes Maß an Erfahrung in Präparation und Auswertung erforderten, und somit für einen möglichen routinemäßigen Einsatz zur Qualitätskontrolle von venösen Grafts nicht geeignet erschienen. Trotz dieser Erschwernisse konnten die bereits in vivo gewonnen Erkenntnisse auch in dieser Versuchsreihe dahingehend bestätigt werden, dass Gefäße, die in kristallinen Lösungen präserviert wurden, einen deutlich schlechteren Grad an Endothelialisierung aufwiesen, als diejenigen, die in den beiden proteinhaltigen Lösungen präserviert wurden. Dabei zeigten die Intimae, der im Plasmaersatzmittel Biseko[®] präservierten Grafts meist weitgehend unversehrtes Endothel ohne größere Läsionen, während in den in 5%iger Albuminlösung präservierten Venenproben, neben relativ weiten, deutlich gefärbten Zellgrenzen auch größere deendothelialisierte Areale zu beobachten waren.

Neben dieser systematischen Reihenuntersuchung unterschiedlich präservierter humaner V. saphena Präparate wurden auch einige Gefäßproben nach zusätzlicher Inkubation im Labor mit blutgruppengleichem Vollblut mittels Rasterelektronenmikroskop untersucht. Hier beobachtete man erneut den großflächigen Erhalt des Endothels in den in „Biseko“ präservierten Venen, während nach dem Einsatz von NaCl-Lösung großflächig nur subendotheliales Gewebe ohne noch vorhandenes - anscheinend „fortgespültes“ - Endothel vorzufinden war. Venenpräparate die in kardiopleger Lösung präserviert worden waren, wiesen dagegen noch größere konfluente „Endothelzell-Rasen“ auf, welche allerdings durch weit geöffnete Zellgrenzen gekennzeichnet waren, in denen sich am subendothelialen Gewebe vermehrt Thrombozyten und neutrophile Granulozyten teilweise bereits in aktivierter Form nachweisbar waren. In einer weiteren ausgedehnten Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurde ein Gerinnungs-Assay entwickelt, der es ermöglichte die Aktivierung der Blutgerinnung - hervorgerufen durch Freilegung des subendothelial lokalisierten Gewebefaktors nach Endothelschädigung - in porcinen und humanen Venenpräparaten zu bestimmen. Die photometrisch gemessene, durch Gewebefaktor katalysierte Faktor X - Aktivierung korrelierte mit dem Ausmaß der endothelialen Schädigung. Das verwendete Schweineohr-Modell bot darüber hinaus den Vorteil, dass präparativ bedingte mechanische Schädigungen der Intima auf ein Mindestmaß reduziert werden konnten, da die Venen während der Versuche in situ im umgebenden Gewebe verblieben. Dadurch war es wiederum möglich, die Faktor X - Aktivierung ausschließlich auf die Wirkung der Präservationslösungen zurückzuführen. Die eigentlichen Messresultate verdeutlichten erneut, dass insuffiziente Präservationslösungen wie z. B. Saline zu einer deutlichen Schädigung des

Endothels führten, während es nach Inkubation mit der untersuchten Plasmaproteinersatzlösung allenfalls zu einer leichten Faktor X-Aktivierung kam.

Bei abschließender Betrachtung aller in der Arbeit angeführten Ergebnisse lässt sich der hohe Stellenwert der zur intraoperativen Lagerung der venösen Grafts verwendeten Präservationslösung für den Erhalt der endothelialen Integrität erkennen.

Zur Minimierung oder sogar Vermeidung intraoperativer Schädigung des Endothels venöser Bypass-Grafts ist, neben der Wahl einer suffizienten Präservationslösung wie z.B. Biseko, auch der standardmäßige Einsatz eines schonenden Saphenektomie-Protokolls und die Vermeidung mechanischer, insbesondere auch Spüldruck-bedingter Endothelschäden unumgänglich. Bei Beachtung dieser Vorbedingungen scheint eine signifikante Verbesserung der bisher unbefriedigenden klinischen Prognose venöser Bypässe mit einem relativ geringen technischen und auch finanziellem Aufwand möglich zu sein.

Literaturverzeichnis

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100:158-73
2. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100:174-90.
3. Amedee T, Robert A, Coles JA. Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia* 1997; 21:46-55.
4. Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, Kikkawa Y. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1983; 52:57-64.
5. Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. *Handb Exp Pharmacol* 2006:1-41.
6. Bassingthwaite JB, Yipintsoi T, Harvey RB. Microvasculature of the dog left ventricular myocardium. *Microvasc Res* 1974; 7:229-49.
7. Boos CJ, Lip GY. Blood clotting, inflammation, and thrombosis in cardio-vascular events: perspectives. *Front Biosci* 2006; 11:328-36.
8. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364:1746-60.
9. Born GV, Kratzer MA. Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. *J Physiol* 1984; 354:419-29.
10. Bouchard BA, Shatos MA, Tracy PB. Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1-9.
11. Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:1081-3.
12. Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem* 1997; 272:21527-33.
13. Chen J, Lopez JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 2005; 12:235-46.
14. Chlopicki S, Lomnicka M, Gryglewski RJ. Obligatory role of lipid mediators in platelet-neutrophil adhesion. *Thromb Res* 2003; 110:287-92.
15. Clausen T. The sodium pump keeps us going. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986:595-602.
16. Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis* 1991; 34:45-68.
17. Culic O, Decking UK, Schrader J. Metabolic adaptation of endothelial cells to substrate deprivation. *Am J Physiol* 1999; 276:C1061-8.
18. Culic O, Gruwel ML, Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 273:C205-13.
19. Damgaard S, Steinbruchel DA, Kjaergard HK. An update on internal mammary artery grafting for coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20:521-4.
20. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999; 29:41-9.
21. Desideri G, Ferri C. Endothelial activation. Sliding door to atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2005; 11:2163-75.
22. Epstein AJ, Rathore SS, Krumholz HM, Volpp KG. Volume-based referral for cardiovascular procedures in the United States: a cross-sectional regression analysis. *BMC Health Serv Res* 2005; 5:42.

23. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:616-26.
24. Gansera B, Schiller M, Kiask T, Angelis L, Neumaier-Prauser P, Kemkes BM. Internal thoracic artery vs. vein grafts--postoperative angiographic findings in symptomatic patients after 1000 days. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 51:239-43.
25. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115:3378-84.
26. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med* 2006; 259:393-400.
27. Green D. Coagulation cascade. *Hemodial Int* 2006; 10 Suppl 2:S2-4.
28. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-95.
29. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21:1-11.
30. Htay T, Liu MW. Drug-eluting stent: a review and update. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1:263-76.
31. Imberty A, Lortat-Jacob H, Perez S. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res* 2007; 342:430-9.
32. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 2006; 104:1223-31.
33. Juchem G, Weiss DR, Gansera B, Kemkes BM, Mueller-Hoecker J, Nees S. Pericytes in the macrovascular intima: possible physiological and pathogenetic impact. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298:H754-70.
34. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31:381-92.
35. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002; 86:41-59.
36. Krucoff MW, Boam A, Schultz DG. Drug-Eluting Stents "Deliver Heartburn." How Do We Spell Relief Going Forward? *Circulation* 2007.
37. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, et al. Neutrophil adhesion to fibrinogen and fibrin under flow conditions is diminished by activation and L-selectin shedding. *Blood* 1997; 89:2131-8.
38. Laskey WK, Yancy CW, Maisel WH. Thrombosis in coronary drug-eluting stents: report from the meeting of the Circulatory System Medical Devices Advisory Panel of the Food and Drug Administration Center for Devices and Radiologic Health, December 7-8, 2006. *Circulation* 2007; 115:2352-7.
39. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269:23357-66.
40. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111:3481-8.
41. Manabe S, Sunamori M. Radial artery graft for coronary artery bypass surgery: biological characteristics and clinical outcome. *J Card Surg* 2006; 21:102-14; 15.
42. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb J* 1993; 7:516-22.

43. Martins e Silva J, Saldanha C. Arterial endothelium and atherothrombogenesis. I--Intact endothelium in vascular and blood homeostasis. *Rev Port Cardiol* 2006; 25:1061-83.
44. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol* 2006; 84:115-24.
45. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998; 97:916-31.
46. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000; 190:300-9.
47. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:507-11.
48. Nissen SE. Atherosclerosis in 2010: new therapeutic insights. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8:70-2.
49. Olson ST, Bjork I, Shore JD. Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin. *Methods Enzymol* 1993; 222:525-59.
50. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med* 2000; 28:S77-80.
51. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32:11-23.
52. Peykar S, Angiolillo DJ, Bass TA, Costa MA. Saphenous vein graft disease. *Minerva Cardioangiol* 2004; 52:379-90.
53. Poston RS, Gu J, Brown JM, et al. Endothelial injury and acquired aspirin resistance as promoters of regional thrombin formation and early vein graft failure after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131:122-30.
54. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000; 440:653-66.
55. Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, Sperandio M, Osterloh K, Gaehtgens P. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol* 1997; 273:H2272-9.
56. Raja SG. Composite arterial grafting. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4:523-33.
57. Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN. Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry* 1990; 29:2606-11.
58. Schlitt A, Pruefer D, Buerke U, et al. Neutrophil adherence to activated saphenous vein and mammary endothelium after graft preparation. *Ann Thorac Surg* 2006; 81:1262-8.
59. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. Effect of the endothelial surface layer on transmission of fluid shear stress to endothelial cells. *Biorheology* 2001; 38:143-50.
60. Shuhaiber JH, Evans AN, Massad MG, Geha AS. Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 22:387-96.
61. Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995; 16:160-70.
62. Solymoss BC, Nadeau P, Millette D, Campeau L. Late thrombosis of saphenous vein coronary bypass grafts related to risk factors. *Circulation* 1988; 78:I140-3.
63. Thomas EL, Lehrer RI, Rest RF. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 1988; 10 Suppl 2:S450-6.

-
64. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982; 60:59-63.
 65. Tretyakov AV, Farber HW. Endothelial cell tolerance to hypoxia. Potential role of purine nucleotide phosphates. *J Clin Invest* 1995; 95:738-44.
 66. van Hinsbergh VW. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95:198-201.
 67. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg* 2006; 61:213-9.
 68. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006; 6:489-99.
 69. Walsh PN. Platelet coagulation-protein interactions. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30:461-71.
 70. Weintraub WS, Jones EL, Morris DC, King SB, 3rd, Guyton RA, Craver JM. Outcome of reoperative coronary bypass surgery versus coronary angioplasty after previous bypass surgery. *Circulation* 1997; 95:868-77.
 71. Weiss DR, Juchem G, Kemkes BM, Gansera B, Nees S. Extensive deendothelialization and thrombogenicity in routinely prepared vein grafts for coronary bypass operations: facts and remedy. *Int J Clin Exp Med* 2009; 2:95-113.
 72. Weiss DR, Juchem G, Eblenkamp M, Kemkes BM, Gansera B, Geier M, Nees S. Search for optimized conditions for sealing and storage of bypass vessels: influence of preservation solution and filling pressure on the degree of endothelialization. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3:10-27.
 73. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007; 21:99-111.
 74. Zhao L, Bath P, Heptinstall S. Effects of combining three different antiplatelet agents on platelets and leukocytes in whole blood in vitro. *Br J Pharmacol* 2001; 134:353-8.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	Arteria
AgNO ₃	Silbernitrat
ATP	Adenosintriphosphat
Carbogen	Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
ECCM	Endothelial cell growth Medium
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FA	Formaldehyd
FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glutaraldehyd
HEPES	N-(2- Hydroxyethyl)-piperazin-N´-(propansulfonsäure)
HEPPSO	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-(2-hydroxypropansulfonsäure)
HTK	kardioplegische Lösung nach Bretschneider
KRT	TRIS-gepufferte Krebs-Ringer-Lösung
PA	Paraformaldehyd
PBS	phosphate balanced saline
PCI	Koronarintervention
SVGD	saphenous vein graft disease
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
V.	Vena
vWF:Ag	von Willebrand Faktor Antigen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Dr. S. Nees** (Physiologisches Institut der LMU München) für die spannende Themenstellung, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung mit vielen hilfreichen Anregungen, sein intensives Interesse am Gelingen der durchgeführten Experimente, sowie für seine substantiellen Ratschläge und Korrekturen bei der Abfassung der vorliegenden Dissertationsschrift. Darüber hinaus möchte ich ihm sowie Herrn **Prof. Dr. J.-C. Tonn** besonders für deren Einsatz und die Unterstützung während einer Episode schwerer gesundheitlicher Beeinträchtigung danken. Diesem Einsatz verdanke ich nicht nur die erfolgreiche Beendigung der vorliegenden Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. U. Pohl** (Vorstand des Physiologischen Instituts der LMU) möchte ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes danken.

Frau **Dr. B. Gansera** und Herrn **Prof. Dr. B.-M. Kemkes** (Abt. für Herzchirurgie im Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen) danke ich sehr herzlich für die unverzichtbare und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit durch Bereitstellung ausgewählter Gewebeproben im Rahmen von der zuständigen Ethikkommission genehmigten Forschungsprojekte.

Herrn **Dr. D.-R. Weiss** gilt mein Dank sowohl für die wissenschaftliche und experimentelle Mitbetreuung, als auch für freundschaftliche Hilfe und Unterstützung bei aufwendigen Versuchen, bei denen zeitweilig mehr als zwei Hände gebraucht wurden, für die ich mich auch bei meinen Kollegen **S. Förch, K. Grimm und S. Matzigkeit** (ebenfalls Doktoranden in der Arbeitsgruppe um Prof. Nees) bedanken will.

Den Herren **F. Singer** und **M. Buchner** (feinmechanische Werkstatt des Physiologischen Instituts) möchte ich vielmals für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre zuverlässige handwerkliche Arbeit bei der Realisierung der benötigten neuentwickelten Apparaturen danken.

Nicht zuletzt gilt mein großer und herzlicher Dank meiner **Frau Julia** sowie meinen **Eltern und Geschwistern**, nicht nur, da sie mich während meines Studiums und der Zeit meiner Promotion stets unterstützt und gefördert haben, sondern besonders, da sie mich zum Zeitpunkt eines gesundheitlichen Rückschlages aufgefangen und mir dann durch eine sehr schwere Folgezeit geholfen haben und immer noch helfen. Letzteres trifft nun besonders auf meine **Töchter Laura Katharina und Johanna Maria** zu.